

Die Rolle des *nucleostemin*-Gens in dem Prozess der Ribosomenbiogenese

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Dr. rer. nat. an der Fakultät für
Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Thomas Jörg Harasim

am
10. September 2009

Diese Arbeit wurde angefertigt am Institut für Klinische Molekularbiologie und
Tumorgenetik des Helmholtz-Zentrum München

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2009

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

München, den 9. September 2009

.....
(Thomas Harasim)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

Ich erkläre weiterhin, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 9. September 2009

.....
(Thomas Harasim)

Inhaltsverzeichnis

Die Rolle des <i>nucleostemin</i>-Gens in dem Prozess der Ribosomenbiogenese.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Vorwort.....	1
1.2 Der Nukleolus	1
1.2.1 Morphologie des Nukleolus.....	1
1.2.2 Die Hauptfunktion des Nukleolus ist Ribosomenbiogenese	3
1.2.3 Weitere Funktionen des Nukleolus	6
1.3 Komplexe und Faktoren in der Ribosomenbiogenese	7
1.3.1 Präribosomale Partikel und ihre dynamische Protein-Zusammensetzung in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.3.2 C-Myc Zielgene kodieren Ribosomenbiogenese-Faktoren im Menschen	9
1.4 Eigenschaften von NST und seines Hefe-Homologs NUG1	12
1.4.1 Bekannte Funktionen von NUG1	12
1.4.2 Bekannte Funktionen von NST	12
1.5 Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Reagenzien	15
2.1.2 Materialien und Kits.....	17
2.1.3 Laborgeräte	18
2.1.4 Software	19
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	19
2.1.6 Kulturmedien	21
2.1.7 Oligonukleotide	22
2.1.8 Antikörper	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.2.2 Restriktionsverdau	26
2.2.3 Ligation von DNA	26
2.2.4 Gelelektrophorese von DNA	26
2.2.5 Transformation von DNA in kompetente <i>E.coli</i> Bakterien.....	27
2.2.6 Mutagenese von <i>nst</i>	27
2.2.7 Umklonierungen der <i>nst</i> -Mutanten in pRTS-1 Expressionsplasmide	30
2.2.8 Klonierungsstrategie zur Herstellung von miRNA-pRTS-1 Vektoren	30
2.2.9 Klonierung in den pMIRTOP-Vektor	31
2.2.10 pMIRTOP-pRTS-1 Umklonierungen.....	31
2.2.11 Kultivierung von humanen Zellen	32
2.2.12 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien.....	32
2.2.13 Bestimmung des Zelltiters und der Viabilität einer Zellkultur.....	33
2.2.14 Transfektion von DNA in humane Zellen.....	34
2.2.15 Selektion von transient transfizierten Zellen.....	34
2.2.16 Induktion von stabilen, konditionalen Zelllinien	35
2.2.17 siRNA- und miRNA- <i>Design</i>	36
2.2.18 siRNA Transfektion in humane Zellen	39
2.2.19 siRNA-Hybridisierung	39

2.2.20	<i>Knock-down knock-in Experimente</i>	40
2.2.21	Radioaktive Pulsmarkierung von zellulärer RNA.....	41
2.2.22	RNA-Isolierung mit Hilfe eines Kits.....	41
2.2.23	RNA-Isolierung mit Hilfe des TRIzol-Reagenz	42
2.2.24	Photometrische Quantifizierung der isolierten RNA	42
2.2.25	Gelelektrophorese der radioaktiven RNA	42
2.2.26	RNA-Geltrocknung.....	43
2.2.27	Autoradiographische Detektion von RNA	43
2.2.28	Herstellung von Protein-Lysaten	43
2.2.29	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.2.30	Western Blotting	45
2.2.31	Immundetektion von Proteinen auf einer Western-Blot Membran.....	45
2.2.32	Herstellung eines NST spezifischen Antikörpers.....	46
2.2.33	Immunfluoreszenz	46
2.2.34	Fluoreszenzmikroskopie	47
2.2.35	Immunpräzipitation (IP).....	47
2.2.36	Sucrose-Gradienten Zentrifugation	48
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>Die nst Mutanten und ihr Phänotyp nach Überexpression</i>	50
3.1.1	Identifizierung der <i>nst</i> Domänenstruktur	51
3.1.2	Klonierung von <i>nst</i> Punkt- und Deletionsmutanten in ein konditionales Vektorsystem	51
3.1.3	Immundetektion der <i>nst</i> Mutanten mit Hilfe eines neu generierten NST Antikörpers..	55
3.1.4	Lokalisationsphänotypen der <i>nst</i> Mutanten	56
3.1.5	Integrität des Nukleolus nach Überexpression der <i>nst</i> Mutanten	58
3.1.6	Effekte überexprimierter <i>nst</i> Mutanten auf die Zellproliferation	60
3.2	<i>Der knock-down Phänotyp von nst</i>	62
3.2.1	Identifizierung von siRNA-Zielsequenzen mit Hilfe von Suchalgorithmen.....	62
3.2.2	<i>Knock-down</i> -Effizienzen der identifizierten siRNAs.....	64
3.2.3	Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> hemmt die Zellproliferation.....	67
3.2.4	Der <i>nst knock-down</i> induziert einen G1/S-Phase Zellzyklusarrest.....	70
3.2.5	Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> verursacht einen 32S rRNA Prozessierungsdefekt.....	71
3.3	<i>Funktionelle Analyse der nst Mutanten in der rRNA-Prozessierung</i>	73
3.3.1	Experimentelles Vorgehen	73
3.3.2	Etablierung und Evaluierung eines Vektor-basierten <i>knock-down knock-in</i> Systems.	75
3.3.3	Der N-Terminus von NST kann den <i>knock-down</i> Phänotyp auf rRNA-Ebene rekonstituieren.....	77
3.3.4	Optimierung der <i>knock-down knock-in</i> Bedingungen	79
3.3.5	Validierung des NST N-Terminus als kleinste funktionelle Proteineinheit in der rRNA-Prozessierung	81
3.4	<i>Interaktionspartner und Ko-Sedimentationsanalyse von NST</i>	86
3.4.1	Ko-Sedimentationsanalysen von <i>nst</i> Mutanten	87
3.4.2	Ko-Immunpräzipitationsanalysen von NST	88
4	Diskussion	92
4.1	<i>NST partizipiert an der Prozessierung der 32S- in die reife 28S rRNA</i>	92

4.2	<i>Die basische Domäne von NST kann den nst-knock-down Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren</i>	94
4.3	<i>Die Herabregulation von NST induziert die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53</i>	100
4.4	<i>Die nukleoläre Lokalisation von NST wird durch eine Kooperation von basischer Domäne und GTP-bindender Motive vermittelt</i>	103
4.5	<i>Ausblick</i>	105
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	108
7	Appendix	126
7.1	<i>Reproduktionsexperiment: Die B6-Mutante kann den nst knock-down Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren</i>	126
7.2	<i>Effekt von Nutlin 3A auf rRNA-Prozessierung</i>	128
7.3	<i>Lokalisation der nukleolären Proteine p53, NST und UBF nach Nutlin3A-Behandlung von U2OS-Zellen</i>	130
7.4	<i>Phylognese des NST-Proteins</i>	133
7.5	<i>Wahrscheinliche Proteinoberflächendomänen von NST</i>	134
8	Curriculum vitae	135
9	Publikationen	136
10	Präsentationen	137
11	Danksagung	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nukleolus-Struktur von HeLa-Zellen (Epoxydharz-Fixierung; Hozak et al., 1994).....	2
Abbildung 2 rRNA-Prozessierung in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (übernommen von Fromont-Racine et al., 2003)	5
Abbildung 3 Markerproteine der präribosomalen Partikel in der Hefe und ihre humanen Homologe (basierend auf Fatica et al., 2002).....	10
Abbildung 4 siRNA-Zielsequenzen in der <i>nst</i> mRNA, welche keine Sequenzpolymorphismen und miRNA Zielsequenzen enthalten.	37
Abbildung 5 Mutanten des <i>nst</i> Gens	52
Abbildung 6 Spleiß- und Protein-Varianten des <i>nst</i> Gens.	53
Abbildung 7 Der induzierbare pRTS-1 Expressionsvektor und sein Induktionsverhalten.	54
Abbildung 8 Der NST-C-Terminus wird vom NST-Antikörper als Epitop erkannt.	56
Abbildung 9 Lokalisationsphänotypen der <i>nst</i> -Mutanten.....	58
Abbildung 10 Die Überexpression der <i>nst</i> Mutanten verursacht keine Lokalisationsänderung von endogenem, nukleolärem NPM.	59
Abbildung 11 Überexprimiertes NST Wildtyp-Protein erhöht die Proliferation von U2OS-Zellen signifikant.	61
Abbildung 12 Das NST-Protein ist über einen Zeitraum von 14h stabil	65
Abbildung 13 Zwei siRNAs können die Menge an NST-Protein signifikant reduzieren	66
Abbildung 14 Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> hemmt die Proliferation in HCT116 p53 +/+ und p53 -/- Zellen.....	68
Abbildung 15 Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> induziert eine Stabilisierung von nukleärem p53.	69
Abbildung 16 Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> induziert einen G1-Zellzyklusarrest.	70
Abbildung 17 Der <i>knock-down</i> von <i>nst</i> induziert einen 28S rRNA-Prozessierungsdefekt	72
Abbildung 18 Ein Vektor basiertes <i>knock-down knock-in</i> Experiment	74
Abbildung 19 Zeitlicher Verlauf der miRNA vermittelten Herabregulierung des NST-Proteins.....	76
Abbildung 20 Ein miRNA vermittelter <i>knock-down</i> von <i>nst</i> verursacht einen nur sehr schwach ausgeprägten 32S Prozessierungsdefekt.	76
Abbildung 21 Die B6-Mutante rekonstituiert rRNA-Prozessierung nach <i>nst knock-down</i>	79
Abbildung 22 Optimierung der initialen Zellzahl und der Induktor-Konzentration zur Durchführung eines siRNA basierten <i>knock-down knock-in</i> Experimentes.....	81
Abbildung 23 Die B6-Mutante kann den <i>nst knock-down</i> Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren.....	84
Abbildung 24 Keine der Punkt- und Doppelmутanten kann den <i>nst knock-down</i> Phänotyp auf rRNA-Ebene rekonstituieren.	86
Abbildung 25 Das B6- und das NST Wildtyp-Protein kosedimentieren mit prä RNPs	88
Abbildung 26 NST interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein p53, jedoch nicht mit Hdm-2, Pes1 oder BOP1.	90
Abbildung 27 Die Mutanten B5, B6 und B10 erlauben eine Kartierung des funktionell essenziellen Aminosäurebereichs des NST-N-Terminus.	96
Abbildung 28 Die I-Domäne verhindert eine nukleoläre Lokalisation des NST Proteins im GTP ungebundenen Zustand.	104
Abbildung 29 Die B6-Mutante kann den 32S Prozessierungsdefekt in einem <i>knock-down knock-in</i> Experiment rekonstituieren	127
Abbildung 30 Eine Nutlin3A vermittelte p53 Stabilisierung induziert einen 32S rRNA Prozessierungsdefekt.....	129
Abbildung 31 Lokalisation der Proteine p53, NST und UBF in HCT116-Zellen nach Nutlin 3A-, Actinomycin D- und DMSO-Behandlung.....	132
Abbildung 32 Phylogenetische Beziehungen von NST- Orthologen in 13 verschiedenen Spezies, basierend auf Poisson-korrigierter Distanz und der UPGMA (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>)-Methode.	133

Abbildung 33 Algorithmus basierte Vorhersage der NST Proteinoberflächendomänen.	134
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Domänenstruktur und Größe der Mutanten von <i>nst</i> in Basenpaaren, Aminosäuren und Dalton	29
Tabelle 2 Durchmesser der einzelnen Zelllinien für eine Coulter Counter® Messung	34
Tabelle 3 siRNA-Zielsequenzen im offenen Leseraster und 3`UTR-Bereich der <i>nst</i> mRNA, identifiziert vom Dharmacon Suchalgorithmus.....	36
Tabelle 4 miRNA-Zielsequenzen im 5`UTR-Bereich der <i>nst</i> mRNA, identifiziert vom Invitrogen miRNA Suchalgorithmus.	38
Tabelle 5 siRNA-Zielsequenzen im Proteinkodierenden- und 3`UTR-Bereich der <i>nst</i> mRNA, identifiziert vom Dharmacon Suchalgorithmus.....	63
Tabelle 6 siRNA-Zielsequenzen im untranslatierten Bereich der <i>nst</i> mRNA, identifiziert vom Rosetta-Suchalgorithmus.....	64

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5'/3'-ETS 5'/3'-External Transcribed Spacer -	externe, transkribierte Sequenz
ActD	Actinomycin D
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH-LZ	basische Helix-Loop-Helix-Leuzinzipper Domäne
BOP1	Block of proliferation 1
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C- Terminus	Carboxy-Terminus
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CMV	Cytomegalie Virus
Co-IP	Ko-Immunpräzipitation
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFC	dichte fibrilläre Komponente
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid(e)
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol (<i>threo</i> -1,4Dimercapto-2,4butanol)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Etidiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorter/ Durchflußzytometer
FC	Fibrilläres Zentrum
FCS	Forwardscatter/
FCS	Fötales Kälberserum
G1	Gap-Phase 1 des Zellzyklus
G2	Gap-Phase 2 des Zellzyklus
GC	Granuläre Komponente
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin-Epitop
Hdm2	humanes Mdm2
HRP	Meerrettichperoxidase
ITS-1/2	interne transkribierte Sequenz 1/2
kB	kilo Basenpaar(e)
kD	kilo Dalton
Lsg.	Lösung
Min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
N- Terminus	Amino-Terminus

NORs	<i>nucleolar organizing regions</i>
NPM	Nucleophosmin
NST	Nucleostemin
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pes1	Pescadillo 1
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
prä-RNP	prä-Ribonuklein-Proteinkomplex
prä-rRNA	Vorläufer rRNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNA Pol I	RNA Polymerase I
RNA Pol II	RNA Polymerase II
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
S-Phase	DNA-Synthesephase des Zellzyklus
SSC	<i>Sidescatter</i> /Seitwärtsstreuung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
UV	ultraviolett
WDR12	<i>WD40-repeat protein 12</i>
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Zellwachstum ist definiert als eine Größen- und Massenzunahme von Zellen. Dies erfordert einen effizienten, anabolen Metabolismus, der Nährstoffmoleküle in bioverfügbare Lipide, Kohlenhydrate und Proteine umwandelt. Die Neusynthese von Proteinen ist hierbei ein wichtiger Prozess und erfordert große Mengen an Ribosomen. Ribosomenbiogenese findet in einer subnukleären Struktur der Zelle, dem Nukleolus, statt. In diesem Kompartiment werden ribosomale Gene (rDNA) in ribosomale RNA (rRNA) transkribiert. Diese nukleoläre rRNA wird dann mit Hilfe von mehreren ribosomalen, als auch nicht-ribosomalen Proteinen (sog. rRNA-Prozessierungsfaktoren) in reife 28S-, 18S- und 5,8S-rRNA prozessiert, welche ein zentraler Bestandteil von Ribosomen sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion des humanen *nucleostemin* (*nst*) Gens in dem Prozess der Ribosomenbiogenese bzw. rRNA-Prozessierung zu untersuchen. Das Forschungsprojekt basiert auf Ergebnissen der Arbeitsgruppe Eick, welche *nst* als ein Zielgen des Transkriptionsfaktors c-Myc identifizierte (Schlosser et al., 2003). NST gehört zu einer Gruppe von evolutionär konservierten Faktoren mit nukleolärer Funktion und wurde in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bereits eingehender untersucht.

Der erste Teil der Einleitung geht kurz auf die Nukleolus-Struktur ein, gefolgt von einer Beschreibung der darin stattfindenden Ribosomenbiogenese inklusive der daran beteiligten Proteine und Proteinkomplexe. Der zweite Teil der Einleitung fasst unser Wissen zu *nst* und seinem Hefe-Homolog *nug1* zusammen.

1.2 Der Nukleolus

1.2.1 Morphologie des Nukleolus

Der Nukleolus wurde ursprünglich als ein ovoides Kernkörperchen beschrieben, welches unter dem Lichtmikroskop einen Durchmesser von 1-2 µm hat (Wagner et al., 1835). In menschlichen Zellen besteht der Nukleolus aus räumlich zusammengelagerten Chromatin-Abschnitten der Chromosomen 13,14,15, 21 und 22, welche in ihren sog. NORs (*nucleolar organizing regions*) die rRNA

kodieren (McClintock et al., 1934). Das Kompartiment des Nukleolus besitzt keine strukturabgrenzende Membran, womit ein ständiger Molekül In- und Exflux möglich ist. In Zellen höherer Organismen ist der Nukleolus während der Zellzyklusprogression eine dynamische Struktur: er löst sich zu Beginn der Mitose-Phase auf und ist erst in der G1-Zellzyklusphase wieder mikroskopisch detektierbar. Die Komponenten des Nukleolus lokalisieren während der Mitose an der Oberfläche der kondensierten Chromosomen (sog. perichromosomale Lokalisation), in sog. NDFs (NDF; *nucleolar derived foci*) und in PNBs (*pre-nucleolar bodies*; Dundr und Olson, 1998; Savino et al., 2001).

Erst mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und entsprechenden Fixierungsmethoden konnten nukleoläre Substrukturen aufgelöst und beschrieben werden.

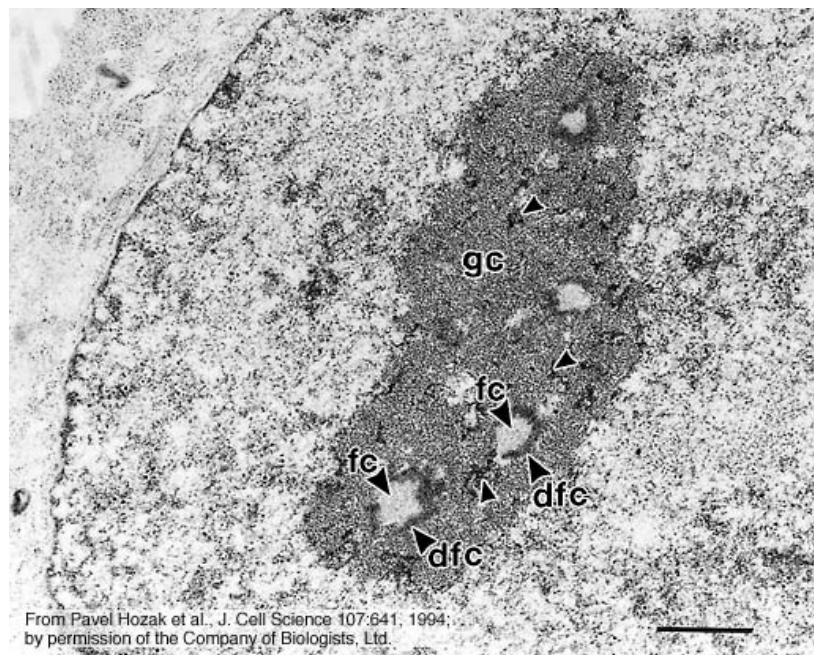


Abbildung 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nukleolus-Struktur von HeLa-Zellen (Epoxydharz-Fixierung; Hozak et al., 1994)

Dargestellt ist ein Ausschnitt eines Zellkerns (hellgrau) mit einem dunkelgrauen Nukleolus. Pfeile deuten nukleoläre Substrukturen an (fc, fibrilläres Zentrum; dfc, dichte fibrilläre Komponente; gc, granuläre Komponente). Der Abbildungsmaßstab (schwarze Linie rechts unten) entspricht einer Größe von 1 μm .

Jeder nukleolären Substruktur aus Abbildung 1 lassen sich spezielle Reifungsschritte der ribosomalen RNA zuordnen (Olson et al., 2004). Die fibrillären Zentren (fc) sind kontrastarme, helle, kreisrunde Bereiche, in denen die

RNA-Polymerase-I-vermittelte Transkription der rDNA-Gene stattfindet. Bereits während der Transkription findet eine Kompaktierung der entstehenden Vorläufer-rRNA (47S rRNA) in ein präribosomales Partikel (prä-RNP) statt. Dieser als 90S Präribosom bezeichnete RNA-Proteinkomplex ist unter dem Elektronenmikroskop als sog. terminales Bällchen der 47S-rRNA sichtbar und bildet im ausgespreizten Chromatin-Kontext die sog. Christbaum-Strukturen aus (Mougey et al., 1993). In den kontrastreichen, dichten fibrillären Komponenten (dfc) des Nukleolus findet hauptsächlich die Prozessierung der rRNA in ihre verschiedenen, von einander separierten 28S-, 5,8S- und 18S-Vorläuferformen statt. Es entstehen mehrere präribosomale Partikel, die in ihrer Proteinkomposition höchst divergent und dynamisch sind (siehe 1.3.1). Dabei kommt es zu einer Aufteilung der prä-RNPs in Komplexe der großen, ribosomalen Untereinheit (sog. prä-60S-Untereinheit) und der 18S rRNA enthaltenen, kleinen ribosomalen Untereinheit (prä-40S-Untereinheit). Die granulären Komponenten bestehen aus kugelförmigen Strukturen von ca. 15-20 nm Durchmesser und sind reich an Nukleinsäuren. In ihnen sammeln sich prä-RNPs, die dann über den Kernporenkomplex in das Zytoplasma transportiert werden. Dort finden letzte Reifungsschritte statt, welche in reifen 60S- und 40S-ribosomalen Untereinheiten münden. Die Zusammenlagerung mehrerer dieser Untereinheiten zu einem sog. 80S Ribosom auf einer mRNA nennt man Polysom.

1.2.2 Die Hauptfunktion des Nukleolus ist Ribosomenbiogenese

Ribosomenbiogenese erfordert die koordinierte Funktion von über 200 Proteinen, welche ein großes rRNA-Vorläufertranskript in drei distinkte rRNAs prozessieren. Die dabei aktiven Endo- und Exonukleasen, Helikasen und ATP/GTPasen sind dabei in der Hefe weitestgehend identifiziert und erlauben eine detaillierte Beschreibung von festgelegten, sequenziellen Prozessierungsschritten (Abbildung 2).

In der Hefe kodiert ein polycistronisches 35S-Primärtranskript die 18S-, 5,8S- und 25S-rRNA, welche durch interne und externe transkribierte Zwischensequenzen voneinander getrennt sind (5'ETS, ITS-1, IST-2, 3'ETS; *internal/external transcribed spacers*; Abbildung 2A). In diesen

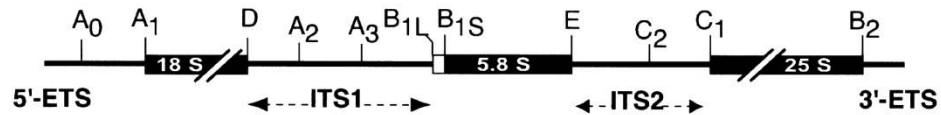
Zwischensequenzen befinden sich die Prozessierungsstellen A0, A1 (5'ETS), A2, A3 (ITS-1), C2 (ITS-2) und die Prozessierungsendpunkte B2, C1, E, B1L, B1S, D. Bereits während der RNA-Polymerase-I-vermittelten Transkription findet, wie bereits oben beschrieben, eine Kompaktierung des 35S-Primärtranskriptes in das 90S Präribosom statt (Mougey et al., 1993). Dabei assemblieren mit der Vorläufer-rRNA vier vorgeformte Proteinkomplexe (t-UTP, UTPb, UTPc, MPPc) und die sog. U3 snoRNA (*small nucleolar RNA*), welche die Prozessierung der Schnittstellen A0, A1 und A2 katalysieren (Krogan et al., 2004; Perez-Fernandez et al., 2007; Gallagher et al., 2004). Der U3 snoRNA kommt dabei die Rolle eines rRNA-Chaperons zu, welches durch Basenpaarung mit der 18S rRNA die Sekundärstruktur letzterer für die Prozessierung optimiert (Borovjagin et al., 2000).

Mit dem 90S Präribosom assembliert auch ein prä-RNP, welches aus vier Proteinen und einer, aus dem Zytoplasma importierten, durch RNA-Polymerase-III transkribierten 5S rRNA besteht (Deshmukh et al., 1993; Steitz et al., 1988; Zhang et al., 2007). Diese rRNA findet sich zusammen mit der 25S- und 5,8S- rRNA in der reifen 60S ribosomalen Untereinheit wieder. Des Weiteren werden im 90S Präribosom zwei chemische Nukleotidmodifikationen durchgeführt: sog. Box C/D snoRNAs katalysieren die Methylierung des 2'Sauerstoff-Atoms einer speziellen Nukleotidribose, während sog. H/ACA snoRNAs die Isomerisierung von Uridin in Pseudouridin induzieren (Cavaillé et al., 1996; Ganot et al., 1997). Diesen snoRNAs kommt dabei, wie im Falle der U3 snoRNA, die Rolle eines rRNA-Sekundärstruktur-Stabilisators zu, welcher eine Enzym-vermittelte Modifikation dirigiert.

Nach endonukleolytischer Prozessierung der 32S rRNA an der Schnittstelle A2 separieren sich 40S- und 60S-prä-RNPs. Die dabei entstehende 27SA2 rRNA kann durch zwei alternative Prozessierungswege in reife 5,8S- und 25S-rRNA überführt werden (Abbildung 2B, Benutzung der alternativen Prozessierungswege mit Prozentangaben). Je nachdem ob die Schnittstelle B1(L) oder B1(S) für einen endonukleolytischen Verdau verwendet wird, entstehen entweder die 27SB(L) oder die 27SB(S) rRNA enthaltenen 60S prä-RNPs. Diese prä-RNPs enthalten die 5,8S-rRNA, welche in einer verkürzten oder langen Form vorliegen kann (5,8S(L) oder 5,8S(S)). Schrittweise wird nun die 27SB-rRNA durch Prozessierung der Schnittstellen B0, B2, A3, C2, C1' und

C1 in verschiedene Zwischenformen überführt, wobei hierbei in höheren Eukaryonten (nicht in der Hefe) die U8 snoRNA die einzelnen Reaktionen dirigiert (Peculis et al., 1993).

A



B

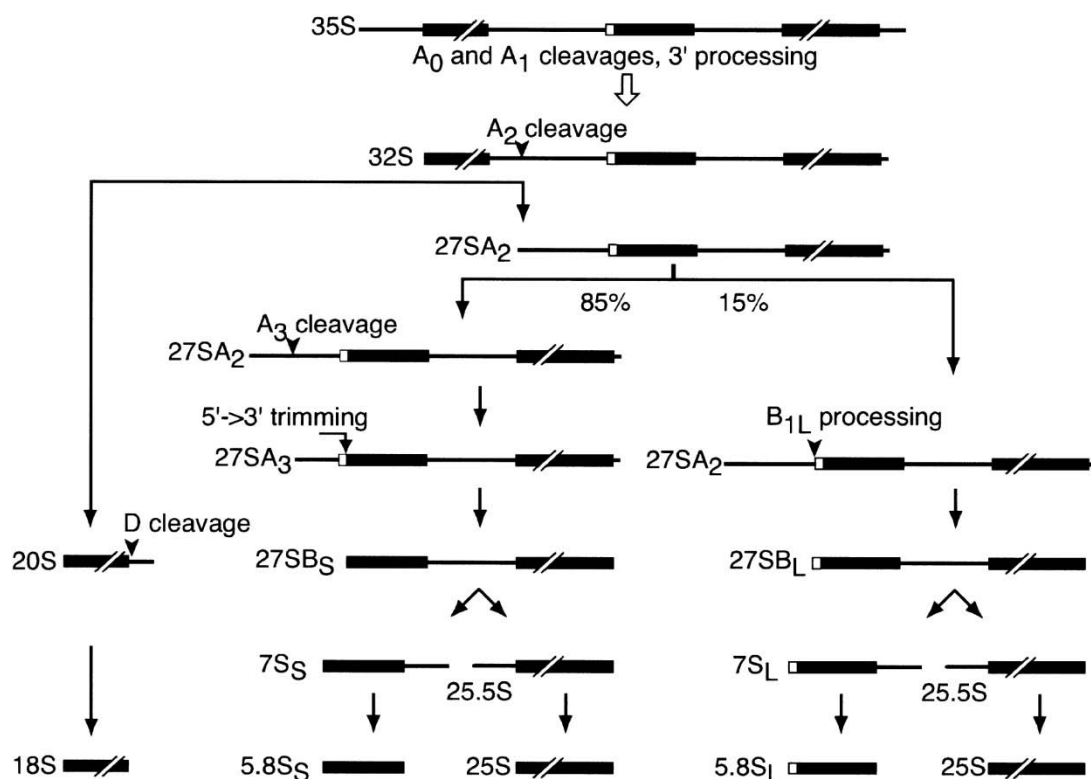


Abbildung 2 rRNA-Prozessierung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (übernommen von Fromont-Racine et al., 2003)

(A) Dargestellt ist das 35S-rRNA-Primärtranskript, welches sich aus internen und externen, transkribierten Zwischensequenzen (ETS/ITS), der 18S-, 5,8S-, und 25S-rRNA zusammensetzt. Des Weiteren sind die Prozessierungsendpunkte und Prozessierungsschnittstellen eingezeichnet. (B) Schematische Darstellung der festgelegten rRNA-Prozessierungssequenz, welche im Text genauer beschrieben wird.

Als Endprodukte liegen die reifen 25S- und 5,8S (S/L)-rRNA-Formen vor. Die Prozessierung der kleinen 40S-ribosomalen Untereinheit ist im Vergleich weitaus weniger komplex. Mehrere Proteine und die U14- und U17 snoRNAs

assemblieren in einem sog. SSU (*small subunit processome*), welches die Überführung der 20S-rRNA in die reife 18S-rRNA übernimmt (Li et al., 1990; Morrissey et al., 1993; Dragon et al., 2002). Die dafür verantwortliche Endonuklease ist noch nicht identifiziert worden.

Die Komplexität der rRNA-Prozessierung lässt die Frage nach distinkten Qualitätskontrollmaßnahmen aufkommen. Tatsächlich ist es so, dass es bei der Entstehung von aberranten rRNA-Zwischenformen oder falsch assemblierten prä-RNPs zu keiner Akkumulation von prä-rRNAs kommt. Dies ist auf den TRAMP/Exosom-Kontrollmechanismus zurückzuführen (Dez et al., 2006; LaCava et al., 2005). Kurz nach der Entstehung von defekten rRNA-Zwischenformen werden diese durch den Trf4-Air2-Mtr4-Polyadenylierungskomplex (TRAMP) polyadenyliert, wodurch sie für den exosomalen Abbauweg markiert werden. Bis jetzt ist jedoch noch nicht geklärt, wie dieser rRNA-Qualitätskontrollmechanismus zwischen defekten und korrekten rRNA-Formen unterscheiden kann.

1.2.3 Weitere Funktionen des Nukleolus

Neben der Ribosomenbiogenese besitzt der Nukleolus weitere Funktionen, die jedoch fast alle mit der Herstellung von RNA assoziiert sind (Olson et al., 2002). So findet beispielsweise die Herstellung der RNA-Komponente des Signalerkennungs-Partikel (*Signal recognition particle*, SRP) im nukleolären Kompartiment statt (Jacobson und Pederson, 1998). Dieses SRP ist ein zytoplasmatisches Ribonukleoprotein-Partikel, bestehend aus einer RNA-Komponente und 6 Proteinen, welches den Import von sekretorischen Proteinen in das endoplasmatische Retikulum kontrolliert.

Des Weiteren lokalisieren humane Telomerase-RNA (hTR) und Telomerase assoziierte reverse Transkriptase (hTERT) während der DNA-Replikationsphase des Zellzyklus in den Nukleoli (Tomlinson et al., 2006). hTR und hTERT sind für die Aufrechterhaltung der chromosomalen Endstücksequenzen (Telomere) notwendig und regulieren somit das Zellteilungspotenzial einer Zelle. Welche Rolle dabei dem Nukleolus zukommt, ist jedoch bis jetzt wenig verstanden.

Schließlich wird dem Nukleolus auch die Funktion eines zellulären Stresssensors zugeschrieben (Rubbi und Milner, 2003). Dieses Modell basiert auf der Tatsache, dass viele Arten der Stressbehandlung von Zellen, sei es mittels

chemischen Agenzien, UV-Bestrahlung oder Hitzeschock, eine Auflösung der nukleolären Struktur zur Folge haben. Dieses Phänomen steht im direkten Zusammenhang mit der Stabilisierung des p53-Proteins, welches z.B. nach UV-Bestrahlung des nicht-nukleolären Kernbereichs nicht stabilisiert wird (Rubbi und Milner, 2003). Mit Hilfe dieses Modells lassen sich auch die Zellzyklus-spezifischen Schwankungen der p53-Proteinmenge erklären: in der frühen G1-Zellzyklusphase ist die Nukleolus-Struktur noch nicht ausgebildet, was sich in erhöhten p53-Mengen in nicht gestressten Zellen äußert. Sobald jedoch der Nukleolus funktionell aktiv wird, sinken die p53-Proteinmengen auf ihr Ausgangsniveau vor Beginn der Mitose zurück. Auch konnte eine nukleoläre Transition von einem RNP bestehend aus p53, ribosomalem Protein L5, der 5,8S rRNA, der 60S ribosomalen Untereinheit und der p53-E₃-Ligase Hdm-2 gezeigt werden (Rubbi und Milner, 2003; Marechal et al., 1994; Samad und Carroll, 1991; Fontoura et al., 1992, 1997). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die strukturelle und damit auch die funktionelle Intaktheit des Nukleolus direkten Einfluss auf die Regulation des p53-Proteins hat.

1.3 Komplexe und Faktoren in der Ribosomenbiogenese

1.3.1 Präribosomale Partikel und ihre dynamische Protein-Zusammensetzung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Assoziation von akzessorischen oder enzymatisch-aktiven Proteinen mit prä-RNPs ist sehr dynamisch. Einige nicht-ribosomale Proteine sind Bestandteil mehrerer präribosomaler Partikel unterschiedlichsten Reifungsgrades, während andere nur kurzweilig mit einem speziellen Intermediat-Komplex interagieren. So interagiert zum Beispiel das RFP2-Protein mit allen 60S-Intermediat-prä-RNPs und ist auch in der reifen, zytoplasmatischen 60S-Untereinheit detektierbar (Zhang et al., 2007). Helikasen wie HAS1 (Emery et al., 2004), ATPasen wie REA1 (Galani et al., 2004), GTPasen wie NUG1 (Bassler et al., 2001), Methyltransferasen wie NOP2 (Kressler et al., 1999) und Exonukleasen wie RAT1 (Henry et al., 1994) zeigen dagegen eine sehr transiente und labile Assoziation mit einem prä-RNP. Die genaue Funktion der oben aufgelisteten Enzyme ist zum Teil nicht bekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Allgemein lässt sich anhand der Protein-Zusammensetzung der prä-RNPs

jedoch der Trend ablesen, dass mit zunehmendem Reifungsgrad der prä-60S-RNPs nicht-ribosomale Proteine dissoziieren bzw. ribosomale Proteine assoziieren. Dieser dynamische Prozess setzt sich auf dem Weg des prä-RNP aus dem Nukleolus in das Zytoplasma fort, wo schließlich die reife 60S ribosomale Untereinheit mit seiner 25S-, 5,8S-, 5S-rRNA inklusive seiner 49 ribosomalen Proteine vorliegt (Wu et al., 1971; Nissan et al., 2002).

Neben dem RFP2-Protein lassen sich noch weitere Faktoren identifizieren, die aufgrund ihrer beständigen Interaktion mit einem speziellen prä-RNP als Markerproteine für letztere verwendet werden können. So lassen sich die Proteine SSF1 (Fatica et al., 2002), NOP7 (Harnpicharnchai et al., 2001), NUG1 (Bassler et al., 2001) und NOG2 (Saveanu et al., 2001) bestimmten Intermediärkomplexen zuordnen, die prä-60S-E₁-, -E₂-, -M- und -L-Intermediate genannt werden (Zhang et al., 2007; Fatica et al., 2002; Abbildung 3). Jeder der vier beschriebenen Komplexe setzt sich aus unterschiedlichen prä-RNAs zusammen, die aus der sequenziellen Prozessierung der 27SA2 rRNA entstehen. Der prä-60S E₁ Komplex beinhaltet die 27SA2- und 27SB-rRNA und zeigt eine nur sehr schwache Assoziation mit der 7S- oder 26S prä-RNA (Bassler et al., 2001). Hingegen lässt sich mit dem prä-60S-E₂-Komplex zwar keine 27SA2-rRNA mehr aufreinigen, jedoch ist eine Anreicherung von 7S und 26S rRNA festzustellen. 7S-, 26S- und 25' S rRNA sind charakteristisch für den prä-60S-M-Komplex. Das letzte prä-RNP, (prä-60S-L) assembliert sich um die 5,8S-, 27SB- und 7S rRNA (Saveanu et al., 2001). Auch bezüglich der RNA-Zusammensetzung der RNPs lässt sich keine eindeutige Zuordnung formulieren, jedoch zeigt jeder Intermediat-Komplex eine Überrepräsentation der oben beschriebenen rRNA-Spezies.

Schließlich ist zu bemerken, dass ribosomale-/nicht ribosomale Proteine nicht einzeln mit prä-RNPs assoziieren, sondern höchstwahrscheinlich als vorgeformte Subkomplexe den Partikeln beitreten. Dafür spricht, dass mindestens 22 der assoziierten Proteine WD40-Domänen besitzen, welche aufgrund ihrer β -Propeller-Tertiärstruktur Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können. Ein Protein-Subkomplex, der eine WD40-Domäne besitzt und in der Hefe als auch in Säugetieren mit einem Prä-RNP assoziiert ist der NOP7-ERB1-YTM1 Komplex (PES1-BOP1-WDR12, PeBoW-Komplex im Menschen).

1.3.2 C-Myc Zielgene kodieren Ribosomenbiogenese-Faktoren im Menschen

C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor mit einer basischen Helix-Schleife-Helix-Leuzin-Reisverschluss-Proteinstruktur. Mit Hilfe seiner N-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne reguliert dieses Protein die RNA-Polymerase-II-vermittelte Transkription einer Vielzahl von Genen, die in so unterschiedlichen Prozessen wie Aminosäure-/Proteinbiosynthese, Apoptose, Energie-Metabolismus, Zelladhäsion und Zellzyklusregulation involviert sind (Coller et al., 2000; Guo et al., 2000; Schuhmacher et al., 1999; 2001; Watson et al., 2002; Menssen et al., 2002; Markinkovic et al., 2004). Ein weiterer von c-Myc kontrollierter Prozess ist Zellwachstum, d.h. eine Zunahme der Zellgröße, welche durch eine verstärkte Proteinbiosynthese und einen erhöhten Energie-Metabolismus erreicht wird. Welche c-Myc Zielgene sind für Zellwachstum verantwortlich? Mit Hilfe von Genchip-Analysen konnte eine Gengruppe von mehr als 300 Genen identifiziert werden, die durch c-Myc signifikant aktiviert werden (Schlosser et al., 2005). Vielen dieser Gene werden nukleoläre Funktionen, wie z.B. eine Beteiligung an der Ribosomenbiogenese zugeschrieben. In dieser Gengruppe fanden sich auch 38 bisher unbekannte c-Myc regulierte Gene, deren Proteine im Nukleolus lokalisieren und evolutionär stark konserviert sind (Schlosser et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe Eick entschloss sich, die c-Myc Zielgene *pes1*, *bop1*, *wdr12*, *ppan* und *nst* zu untersuchen. Drei Hefe-Homologe, NOP7, ERB1 und YTM1 sind funktionell ausführlich beschrieben und partizipieren an der Ribosomenbiogenese (Du und Stillman, 2002). Der NOP7-ERB1-YTM1-Komplex assoziiert mit dem prä-60S-E2-RNP und ist für die Prozessierung der 5,8S- und 25S-rRNA mitverantwortlich. Die humanen Homologen Pes1, BOP1 und WDR12 formen ebenfalls einen trimeren Komplex und werden für die Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit benötigt. Die Überexpression von dominant-negativen *pes1*-, *bop1*- oder *wdr12*-Mutanten oder ein RNAi-vermittelter Gen-*knock-down* resultiert in einem 32S rRNA-Prozessierungsdefekt, der einen reversiblen, p53 induzierten G1/S-Phase Zellzyklusarrest zur Folge hat (Pestov et al., 1998; Strezoska et al., 2000; 2001; Holzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Pes1, BOP1 und WDR12 assemblieren nach einem hierarchisch Prinzip zum PeBoW-Komplexes, welcher mit prä-RNPs assoziiert (Rohrmoser et al., 2007).

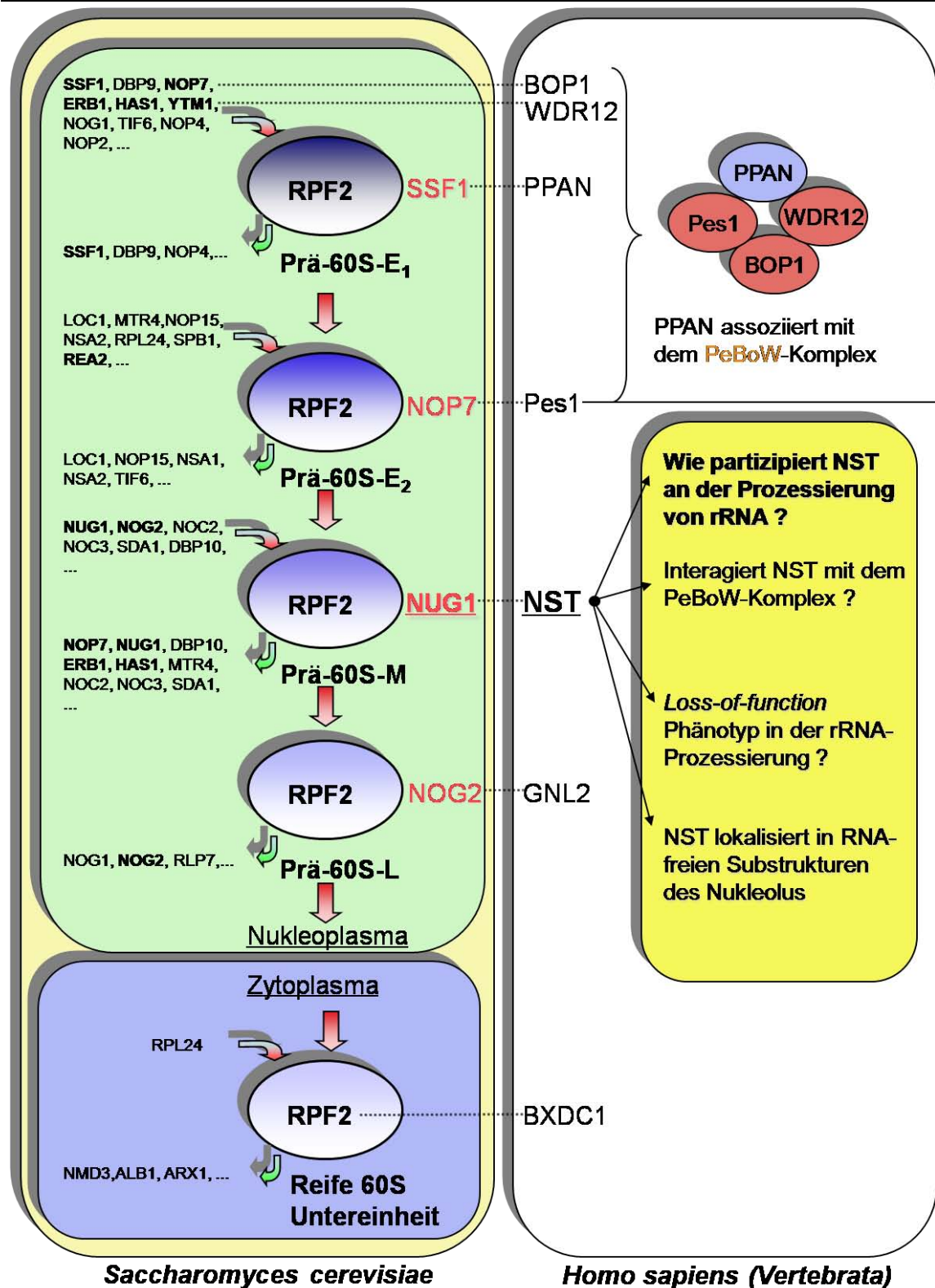


Abbildung 3 Markerproteine der präribosomalen Partikel in der Hefe und ihre humanen Homologe (basierend auf Fatica et al., 2002)

Das RPF2-Protein ist in allen 5 prä-RNPs vorzufinden. Die Faktoren links von den prä-RNP assoziieren (roter Pfeil) oder dissoziieren (grüner Pfeil) mit den prä-60S-E₁/E₂/-M/-L- RNPs. Faktoren, welche fett dargestellt sind, werden im Text genauer beschrieben. Mit Hilfe der rot dargestellten Hefeproteine lassen sich die

entsprechenden Komplexe mittels Immunpräzipitation aufreinigen. Die humanen Proteine Pes1, BOP1 und WDR12 bilden den sog. PeBoW-Komplex aus, mit dem auch das PPAN-Protein (homolog zu SSF1) assoziiert. Das NUG1-Homolog NST ist nicht als rRNA-Prozessierungsfaktor oder PeBoW-Interaktionspartner beschrieben (gelber Kasten). Bereits publizierte Daten favorisieren NST dagegen eher als Protein, welches aufgrund seiner Lokalisation in RNA-freien Nukleolus-Substrukturen nicht an der rRNA-Prozessierung beteiligt ist (Politz et al., 2005; siehe auch 1.4.2).

BOP1 ist eine integrale Komponente des PeBoW-Komplexes und bildet vor der eigentlichen Assemblierung des trimeren Kernkomplexes einen Pes1-BOP1 Subkomplex aus. Erst dann erfolgt eine Interaktion mit WDR12. Wann genau dieser Proteinkomplex mit prä-RNPs assoziiert und welche distinkte Funktion er in der rRNA-Prozessierung hat, ist Gegenstand aktueller Forschung.

In der Hefe interagiert das NUG1-Protein mit den PeBoW-Homologen in einem gemeinsamen Komplex (Du und Stillmann, 2002). So konnte mittels massenspektrometrischer Analyse von NOP7-Ko-Immunpräzipitaten die Existenz eines 2 MDa großen Proteinkomplexes bewiesen werden, welcher unter anderem aus den Proteinen ERB1, YPH1, RPL2, 3, 24, SWD3, TIF6 und NUG1 besteht. NUG1 fungiert als nukleolärer Exportfaktor von prä-RNPs und partizipiert an der Prozessierung der 25S rRNA (Bassler et al., 2001). Das humane Homolog von NUG1 ist Nucleostemin (NST), welches bis jetzt nicht als PeBoW-interagierender Faktor beschrieben worden ist. Die transkriptionelle Regulation des *nst*-Gens erfolgt ebenso wie für die PeBoW-Gene durch c-Myc (Schlosser et al., 2003). *Nst* wurde ursprünglich als ein Gen von Stammzellen des Zentralnervensystems identifiziert, welches nach Differenzierung letzterer nicht mehr exprimiert wird (Tsai und McKay, 2002; siehe auch 1.4.2). Des Weiteren interagiert NST mit dem p53-Tumorsuppressor und nimmt auf unbekannte Art und Weise Einfluss auf die zelluläre Proliferationskontrolle. NST lokalisiert im Nukleolus.

NST und NUG1 sind hoch konserviert und zeigen eine Sequenzhomologie von 40,2% (ClustalW-Alignment 1.83). Welche funktionellen Ähnlichkeiten NST und NUG1 haben, wurde bisher noch nicht untersucht. Z.B. ob NST mit dem PeBoW-Komplex interagiert und somit an der Reifung der 28S rRNA partizipiert? Wie sieht der *loss-of-function* Phänotyp von NST in der rRNA-Prozessierung aus? Diese Fragen sollen in dieser Arbeit unter anderem beantwortet werden.

1.4 Eigenschaften von NST und seines Hefe-Homologs NUG1

1.4.1 Bekannte Funktionen von NUG1

NUG1 (nukleoläre GTPase) wurde ursprünglich als ein ECM1 interagierender Faktor beschrieben (Bassler et al., 2001). ECM1 ist in der Hefe am Kernporenkomplex-vermittelten Export von ribosomalen Untereinheiten in das Zytoplasma beteiligt. Nach Expression einer Temperatur-sensitiven (ts) *nug1*-Mutante akkumulieren ribosomale Proteine im Nukleolus und Zellwachstum wird blockiert. Die ts-Mutante verursacht ebenfalls einen rRNA-Prozessierungsdefekt und Prozessierung der 35S rRNA ist verzögert. NUG1 ist demnach ein (prä-ribosomaler Faktor, der in bestimmten Kernporenkomplex-assoziierten prä-RNPs residiert und an der rRNA-Prozessierung und dem Transport der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt ist.

1.4.2 Bekannte Funktionen von NST

Das *nst*-Gen wurde in einer subtraktiven cDNA Bibliothek von Stamm- und terminal differenzierten Zellen entdeckt (Tsai und McKay, 2002). Entsprechend konnte das NST-Protein in verschiedenen Stammzellen nachgewiesen werden, wo es während des Differenzierungsprozesses stark herabreguliert wird. Die Namensgebung von *nucleostemin* beruht auf seiner präferenziellen Expression in Stammzellen (engl. *stem cells*) und der dominanten nukleolären Lokalisation des Proteins. Die nukleoläre Lokalisation von NST wird hauptsächlich durch seine GTP-Bindungsmotive und dem N-Terminus mit seiner basischen Domäne reguliert (Tsai und McKay, 2005).

Als Bindungspartner von NST wurden bisher die Proteinphosphatase -2 PPP2R5A (Yang et al., 2005), das Myb Bindungsprotein, MybBP1p160 (Yamauchi et al., 2008) und TRF-1 (Telomer-Bindungsfaktor-1; Zhu et al., 2009) beschrieben. TRF-1 ist ein Suppressor der Telomer-Längenelongation und somit verantwortlich für das limitierte Replikationspotenzial einer Zelle (Epel et al., 2004). Die Interaktion von NST und TRF-1 resultiert in einer Ubiquitin-abhängigen Degradation von TRF-1, womit zelluläre Seneszenz verhindert wird. Diese Funktion von NST kann sowohl für die Selbsterneuerung von pluripotenten Stammzellen, als auch bei der Onkogenese eine entscheidende Rolle spielen.

Weitere Erkenntnisse zur NST-Funktion in lebenden Organismen basieren auf einem konstitutiven- und einem konditionalen *knock-out* Mausmodell (Beekman et al., 2006; Normura et al., 2009). Mäuse mit einem konstitutiven NST-Genverlust sterben am Tag 4 der Embryogenese (Beekman et al., 2006). In den entsprechenden *nst* (-/-) Blastocysten ist NST allerdings nicht für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz oder der nukleolären Integrität notwendig. Jedoch sind diese Zellen nicht in der Lage in die DNA-Replikationsphase einzutreten, auch dann nicht wenn p53 funktional inaktiv ist. Haploinsuffiziente Maus-Embryo-Fibroblasten besitzen eine verringerte Proliferationsrate. Letztere Beobachtung konnte auch im konditionalen *knock-out* Mausmodell bestätigt werden (Normura et al., 2009). Sowohl Stammzellen, als auch partiell differenzierte, neuronale Vorläuferzellen proliferieren in Abwesenheit von NST signifikant langsamer und zeigen eine erhöhte Apoptoserate. Beide Phänomene basieren auf einer Induktion und Stabilisierung von p53 bzw. einer vermehrten Aktivierung der Apoptose assoziierten Caspase-3-Protease.

Des Weiteren interagiert NST direkt mit Tumorsuppressor p53 und seiner E₃-Ligase Hdm-2 (Tsai und McKay, 2002; Dai et al., 2008). Beide Interaktionen werden durch den N-Terminus von NST vermittelt. Der biologische Zweck dieser Interaktionen ist jedoch bis jetzt ungeklärt und es liegen widersprüchliche Daten bezüglich der Rolle von NST an der p53-Hdm-2 Regulationsschleife vor (Meng et al., 2008; Huang et al., 2009). Ein Modell postuliert eine stressinduzierte Bindung von nukleärem NST an Hdm-2, wodurch letzteres nicht mehr an p53 binden und es somit ubiquitinieren kann (Huang et al., 2009). Daraus resultiert eine beobachtbare Erhöhung der p53-Menge und ein proteasomaler Abbau des NST-Proteins. Ein anderes Modell basiert auf der Annahme, dass nukleolärer Stress eine Translokation von NST in das Nukleoplasma induziert und dort Hdm-2 stabilisiert (Meng et al., 2008). Der dadurch induzierte proteasomale Abbau von p53 verhindert Apoptose und ermöglicht ein Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus.

Des Weiteren interagiert NST mit dem Hdm-2 Regulator p14ARF (Ma et al., 2007; Dai et al., 2008; Meng et al., 2008). ARF wurde als ein Tumorsuppressor beschrieben, welcher eine p53- Hdm-2 Interaktion verhindert und die E₃-Ligase in den Nukleolus sequestriert (Tao und Levine, 1999; Sherr und Weber, 2000). Die Überexpression von p14 resultiert in einer Herabregulation von NST (Ma et

al., 2007). Diese Rückkoppelungsschleife funktioniert auch *vice versa*: ein siRNA-vermittelter *knock-down* von ARF bedingt eine verstärkte NST Expression.

Die bekannte Ribosomen-Export-Funktion des Hefe-Homologs NUG1 und die nukleoläre Lokalisation des humanen NST-Proteins favorisieren eine Beteiligung von NST an der rRNA-Prozessierung. Jedoch zeigte eine Ko-Färbung von NST und UBF (*upstream binding factor*), einem Markerprotein für die fibrillären Zentren des Nukleolus, keine Ko-Lokalisation beider Proteine an (Politz et al., 2005). Auch lokalisiert NST nicht in der dichten, fibrillären Komponente (dfc), da eine Ko-Lokalisation mit dem dfc-Markerprotein Fibrillarin ausgeschlossen werden konnte. Dagegen sind deutliche NST-Signale in der RNA-freien, granulären Komponente des Nukleolus detektierbar. Die Autoren dieser Studie zweifeln somit an einer Beteiligung dieses Proteins an der Ribosomenbiogenese. Die Lokalisation von NST in RNA-freien Zonen der granulären Komponente des Nukleolus favorisiert den Autoren zufolge andere, nicht-ribosomale Funktionen von NST.

1.5 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war nur wenig über die Funktion des NST-Proteins bekannt. So lagen neben den Beschreibungen des Hefehomologs NUG1 in der Hefe (Bassler et al, 2001) nur die beiden Veröffentlichungen von Tsai und McKay vor (Tsai und McKay, 2002; 2005). Die Tatsache, dass NUG1 als ribosomaler 60S-Exportfaktor bzw. 25S rRNA-Prozessierungsfaktor fungiert und humanes NST im Nukleolus lokalisiert, resultierten in der Hypothese, dass NST an der Prozessierung der 28S rRNA beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Punkt – und Deletionsmutanten des *nst* Gens generiert und RNAi-vermittelte *knock-down* Experimente durchgeführt werden. Folgende Fragen sollten somit beantwortet werden: Welche Domänen von NST sind für nukleoläre Lokalisation/Funktion essenziell? Welche der Mutanten wirken dominant-negativ auf Zellproliferation/rRNA-Prozessierung? Wie sieht der *loss-of-function* Phänotyp von NST in der rRNA-Prozessierung aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
(³² P) Orthophosphat	Hartmann-Analytik, Braunschweig
1-kb-DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
(Bis)-Acrylamid Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Hamburg
Agar	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg
BSA Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Coulter-ISOTON	Beckman Coulter
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Hamburg
DAPI	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dialysiertes fötales Kälberserum	BeckmanCoulter, Krefeld
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMEM	Invitrogen/GIBCO, Karlsruhe
dNTP	Promega, Mannheim
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Hamburg
ECL Detektionsreagenz	GE-Healthcare, München
ECL plus Detektionsreagenz	GE-Healthcare, München
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Formaldehyd-Lösung 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin 87%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt

Reagenz	Hersteller
HEPES	Merck, Darmstadt
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Klenow Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
L-Glutamin	PAA, Invitrogen, Karlsruhe
Luria Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
MG-132	Sigma-Aldrich, Hamburg
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS 3-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg
Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
NP40-10%-Lösung	Roche, Mannheim
Nutlin 3A	Sigma-Aldrich, Hamburg
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM; Serum freies Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	PAA, Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Oligonukleotide	metabion, Martinsried
Penicillin/Streptomycin	Promega, Mannheim
Pfu DNA Polymerase	Carl Roth, Karlsruhe
Phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
PIPES	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Qiagen, Hilden
PolyFect® DNA Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Protein A-Agarose	Roche, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Proteinase inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNAse A	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse Away	Carl Roth, Karlsruhe
RNAseOUT™ <i>Ribonuclease Inhibitor</i>	Invitrogen Karlsruhe
RNAasin <i>RNAse inhibitor</i>	Merck, Darmstadt

Reagenz	Hersteller
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
siRNA Oligonukleotide	Sigma-Genosys, Paris
Sodium Desoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH
Sodiummolybdat	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumorthovanadat	Merk, Darmstadt
Sparfloxacin	ICN, Northeim
Sucrose	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Carl Roth, Karlsruhe
T4-Polynucleotidkinase	Merck, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Merck, Darmstadt
TEMED	Peqlab, Erlangen
TriFast	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Sigma-Aldrich, Hamburg
Triton X-100	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin-EDTA	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Hamburg
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Materialien und Kits

Material/Kit	Hersteller
Blotting Papier GB003/GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Einmal-Filter 0.22µm	Millipore, Schwalbach
Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Glasbeads	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glasplättchen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Glaswaren	Schott, Jena
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE-Healthcare, München
Hybond PVDF Membran	GE-Healthcare, München
Hypercasette 18x24cm	Amersham, Freiburg
Hyperfilm ECL	GE-Healthcare, München
Hyperfilm MP	GE-Healthcare, München
Injektionsnadeln	Braun, Melsungen
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
MicroSpin S-200HR Säulen	GE-Healthcare, München

Material/Kit	Hersteller
MinElute Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden; Peqlab, Erlangen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
peqGOLD Total RNA Kit (S-Linie)	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen	Carl Roth, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polypropylengefäße (15ml; 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
QiaShredder Säulen	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
UV-Messküvette "Üvette"	Eppendorf, Hamburg
Zellkultur-Plastikmaterialien	Greiner, Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden

2.1.3 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Axiovert 200M Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen
Bench-top Radioisotop-Detektor	Bioscan Washington D.C., USA
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Gel Air Trocknungssystem	BioRad Laboratories, Hercules, CA
GS Gene Linker UV Bestrahlungskammer	BioRad Laboratories, Hercules, USA
GS Gene Linker™ UV Kammer	BioRad Laboratories, Hercules, CA
Innova™ 4400 Schwenkinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
LS 5000 TA Scintillation Counter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese Laufkammer	Bio-Rad, München
Mini-Sub Cell GT Elektrophorese- Zelle	Bio-Rad, München
OTD Combi Ultrazentrifuge	Sorvall, Langenselbold
PCR Sytem Px2	ThermoHybaid
Phosphoimager FLA-5100	FujiFilm, Tokio
Photometer GS320	Eppendorf, Hamburg
PowerPac 200 Netzteil	Bio-Rad, München
Speed Vac Konzentrationszentrifuge SVC100H	Savant Instruments NC, Farmingdale, N.Y. USA
Spektrophotometer DU-64	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Stereomikroskope	Leica Microsystems, Wetzlar
Stratalinker U249	Stratagene, Amsterdam
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Semi-Dry	Bio-Rad, München
UZ-PA-38,5-1 Ultrazentrifug-Gefäße	Kisker GbR, Steinfurt

Laborgerät	Hersteller
Zellkultur Inkubator HERA cell 150	Thermo scientific, Schwerte
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge RC5B Plus	SORVALL, Langenselbold
Zentrifuge RC5B Plus	Thermo Scientific Kendro, Schwerte
Zentrifuge RC5C	SORVALL, Langenselbold

2.1.4 Software

Software-Programm	Hersteller
Openlab® 3.08	Improvision, Coventry, UK
Openlab® 5.01 Demo-Version	Improvision, Coventry, UK
Adobe Photoshop® 7.0	Adobe, USA
Office 2004 für Macintosh Computer©	Microsoft Cooperation, USA
MacVector® 9.0	Oxford Molecular Group, UK
Aida 2D Densitometrie©	Raytest, Straubenhardt
Graphic Converter©	Lemke Software, Peine
Endnote® 6.0	Thomson, USA
Cellquest® 3.3	BD Biosciences, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösungen	Zusammensetzung
10x MOPS-Puffer	41,8 g MOPS in 800 ml DEPC-H ₂ O, pH 7,0; 16,6 ml 3 M NaAc/DEPC-H ₂ O, 20 ml 0,5 M EDTA/DEPC-H ₂ O, add 1l ddH ₂ O, Lagerung bei RT und lichtgeschützt.
4% Paraformaldehyd-Lösung	4 g Paraformaldehyd auf 100 ml PBS-Puffer, NaOH-Plättchen, pH 7,4
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in ddH ₂ O, bei 37°C über Nacht inkubiert und autoklaviert;
DNA Ladepuffer 6x	0.03% Bromphenolblau, 0.03% Xylencyanol, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM EDTA, pH 8.0, 30% Glycerol
Doxycyclin-Stocklösung	1 mg/ml in ddH ₂ O, lichtgeschützt bei 4°C gelagert

Puffer oder Lösungen	Zusammensetzung
Hygromycin	50 mg/ml Stocklösung, lichtgeschützt bei 4°C gelagert, Selektionskonzentration: 100 µg/ml
IP Waschpuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X100, 1 mM PMSF
IP Lysispuffer (=Sucrose-Gradient-Lysispuffer)	10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2% Protease Inhibitor (Roche), 1 mM Na ₂ MoO ₄ , 1 mM NaVO ₃ , 0.1% SDS
Laemmli Lysepuffer 2x	100 mM Tris/HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% Bromphenolblau, 20% Glycerol, 5 mM EDTA, 200 mM DTT
PBS-Puffer	80 g NaCl, 14.4 g NaH ₂ PO ₄ , 2.4 g NaH ₂ PO ₄ , 2 g KCl pH 7.4, add 1l ddH ₂ O, autoklaviert
Ponceau S Lösung	0.1% Ponceau S, 5% Essigsäure
Protease Inhibitor (Roche)	1 Tablette in 1 ml H ₂ O
Puromycin	10 mg/ml in ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C, Verdünnung: 1:10000
RNA Ladepuffer	50% Formamid, 15% Formaldehyd (37%), 1x MOPS pH 7.0, 0.1% Bromphenolblau, 20 µg/ml Ethidiumbromid
RNA-Gelelektrophorese-Laufpuffer 10x	200 ml MOPS-Puffer 10x, add 2000 ml ddH ₂ O
SDS 10%	10% (w/v) Sodiumdodecylsulfat
siRNA-Hybridisierungspuffer	100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
Sparfloxacin	20 mg/ml in 0.1 N NaOH, bei 4°C lichtgeschützt gelagert, Verdünnung 1:2000
TBS 1x	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl
TBST washing buffer 1x	1X TBS, 0.1% Tween® 20

Puffer oder Lösungen	Zusammensetzung
TE Puffer 10x	100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA
Tris/SDS pH 6.8-Sammelgelpuffer	250 mM Tris Base, 0.2% SDS, pH 6,8
Tris/SDS pH 8.8 Trenngelpuffer	750 mM Tris Base, 0.2% SDS, pH 8,8
Western Stripping Lösung	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 M Mercaptoethanol, 2% SDS
Western-Laufpuffer 10x	30 g Tris, 144 g Glycin, 1% SDS
Western-Transfer Puffer	3 g Tris, 14.4 g Glycin, add 1l H ₂ O 20% Methanol

2.1.6 Kulturmedien

Kulturmedien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
Luria Bertani Agarplatten	1% Pepton 140, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,1% Glucose, 2% Agar, Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (200 µg/ml)
Luria Bertani Medium	1% Pepton 140, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,1% Glucose, Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (200 µg/ml)

Kulturmedien für humane Zelllinien

Medium/Supplement	Hersteller
100x L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
1000x Doxycyclin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich
100x Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
2000x Sparfloxacin (20 mg/ml in 0,2 N NaOH)	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
DMEM-Vollmedium	supplementiert mit 5 ml Penicillin /Streptomycin (100x), 5 ml L-Glutamin (100x), 51 ml fötalem Kälberserum; (Invitrogen/GIBCO)
DMEM-Vollmedium phosphatfrei	supplementiert mit 10% dialysiertem, fötalem Kälberserum und Doxycyclin, (Invitrogen/GIBCO)

Medium/Supplement	Hersteller
Einfriermedium	50% Fötales Kälberserum, 40% DMEM-Vollmedium, 10% DMSO
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Colbe
Fötales Kälberserum (dialysiert)	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B (50mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Oligonukleotide

DNA-Zielsequenzen für siRNAs

siRNA	Sequenz
Tsai und McKay (ORF)	5'- AAG AAC TAA AAC AGC AGC AGA-`3
Dharmacon 3'UTR	5'- GTA TGC ATG AGC TGT GTA AAT-`3
Rosetta 5'UTR1	5'- CTC GTC AGT GGC TTC AGT TTT-`3
Rosetta 5'UTR2	5'- GTT GAT GTG TTT GTG CTT CTT-`3
Rosetta 3'UTR1	5'- CAA TTC ATC TCA TTG TGA GTT-`3
Rosetta 3'UTR2	5'- CTC ATT GTG AGT GGA AGT ATT-`3
Rosetta 3'UTR3	5'- CAT TGT GAG TGG AAG TAG CTT-`3
Kontrolle (Luziferase)	5'- TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTT-`3

DNA-Zielsequenzen für miRNAs

miRNA	Sequenz
miNST	5'- TGC TGT ATT CCA GAT AAC TAC TTC CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGG AAG TAT ATC TGG AAT A-`3
miPes1	5'- TGC TGT GGT CCA TCA CAC TTA GGT CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGA CCT AAG TGA TGG ACC A-`3
miLuziferase	5'- TGC TGA ATG GTA GGG CGG AAT GTC AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CTG ACA TTG CCC TAC CAT T-`3

Fette Buchstaben deuten die miRNA Zielsequenz an.

PCR-Primer

PCR Primer	Sequenz
B1 Vorwärtsprimer	5'-GCC ACC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG-3'
B1 Rückwärtsprimer	5'- CAC ATA ATC TGT ACT GAA GTC-3'
B5 N-terminaler Deletionslinker vorwärts	5'- CTA GCC ACC ATG GTG GCA TAG-`3
B5 N-terminaler Deletionslinker rückwärts	5'-CGA TAG CTT TGG GGG AAT CGC-`3
B6 Vorwärtsprimer	5'-GCC ACC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG-`3

PCR Primer	Sequenz
B6 Rückwärtsprimer	5'- CTC GAT GGT AAC CCT CCT TTT CCA TAG GTT CCA-`3
B7 Vorwärtsprimer	5'-GGT TTC CCA AAT GTG GCA GCA GCT AGC ATT ATC AAT AGC-`3
B7 Rückwärtsprimer	5'-GCT ATT GAT AAT GCT AGC TGC TGC CAC ATT TGG GAA ACC-`3
B8 Vorwärtsprimer	5'-GTT GGA GTA ATT GGT TTC GGT AAC GTG GGG AAA AGC AGC-`3
B8 Rückwärtsprimer	5'-GCT GCT TTT CCC CAC GTT AAC GAA ACC AAT TAC TCC AAC-`3
B9 Vorwärtsprimer	5'- CTG GTA CTT ATA TTA AAT GCA TCA CTT CTG GTA CCA AAG GAG-`3
B9 Rückwärtsprimer	5'-CTC CTT TGG TAC CAG AAG TGA TGC ATT TAA TAT AAG TAC CAG-`3
B10 Vorwärtsprimer	5'- GCA CTC GAG CCA CCA TGA CCT GCC ATA A -`3
B10 Rückwärtsprimer	5'- CAC ATA ATC TGT ACT GAA GTC-`3

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper

Primärer Antikörper gegen	Hersteller	Spezies	Verdünnung
NST (7H3)	Helmholtz-Zentrum München, Arbeitsgruppen Eick/Kremmer	Ratte	WB + IF: 1:10
Aktin (7B29)	Sigma Aldrich, Hamburg	Kaninchen	WB: 1:25000
c-Myc (N262)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Ratte	WB:1:250
HA (3F10)	Helmholtz-Zentrum München, Arbeitsgruppen Eick/Kremmer	Ratte	WB: 1:10 IF: 1:1000
Hdm-2 (SMP14)	Sigma Aldrich, Hamburg	Maus	WB:1:1000
NOG1 (1D8)	Helmholtz-Zentrum München, Arbeitsgruppen Eick/Kremmer	Ratte	WB + IF: 1:10
NPM (FC-9)	Sigma Aldrich, Hamburg	Maus	WB: 1:12000 IF: 1:1000
p53 (DO-1)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Maus	WB: 1:2000 IF: 1:200
Pes1 (8E9)	Helmholtz-Zentrum München, Arbeitsgruppen Eick/Kremmer	Ratte	WB: 1:10 IF: 100

Primärer Antikörper gegen	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Tubulin (DM1)	Sigma Aldrich, Hamburg	Maus	WB: 1:40000
UBF	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Maus	IF: 1:100

Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper gegen	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Karnickel-HRP (W401B)	Promega, Mannheim	Ziege	1:5000
Maus-Cy3 (-062)	Dianova, Hamburg	Maus	1:500
Maus-HRP (W402B)	Promega, Mannheim	Ziege	1:5000
Ratte-Cy3 (-167)	Dianova, Hamburg	Ziege	1:1000
Ratte-HRP (-062)	Dianova, Hamburg	Ziege	1:10000

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ortsspezifische, mutagenisierende PCR

Diese, auch als *site directed mutagenesis* PCR bekannte Methode wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit zur Einbringung von Punktmutationen und zur Deletion kodierender DNA-Sequenzen verwendet. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

10x Pfu Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix (10µM)	1,5 µl
Primer (10µM)	je 1 µl
Templat-DNA	10 ng
Pfu Polymerase	5 Einheiten
Add Reinst-Wasser	50µl

Es wurde darauf geachtet, dass die Pfu-DNA-Polymerase erst nach der Zugabe der Nukleotide zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurde, da es sonst zu einer Polymerase-vermittelten Degradierung der DNA-Primer kommt (3'-5'-Exonuclease-Aktivität der Pfu-DNA-Polymerase). Das Programm zur

Durchführung dieser Polymerasekettenreaktion in einem *Thermocycler* umfasste folgende Schritte :

95°C	5 Minuten	} 18 Zyklen
95°C	30 Sekunden	
T _M (Primer)– 5°C	30 Sekunden	
74°C	1 Minute pro kB	
74°C	10 Minuten	

Danach wurde die Templat-DNA durch einen *DpnI* – Verdau über Nacht bei 37 C aus dem PCR-Reaktionsmix entfernt. Es folgte eine Hitzeinaktivierung des *DpnI* - Enzyms bei 80°C für 20 Minuten in einem Heizblock.

Kolonie-PCR

Einzelkolonie-PCR-Reaktionen wurden durchgeführt, um die Orientierung von in Vektoren einklonierte DNA-Sequenzstücke zu überprüfen. Dazu wurde eine sterile Pipettenspitze mit Bakterien einer Kolonie kontaminiert. Diese Pipettenspitze wurde zur Okulation einer weiteren Bakterien-Ko-Kultur und eines vorgefertigten 20 µl PCR-Reaktionsmix verwendet. Positive Klone, die durch eine PCR-Reaktion mit anschließender Gelelektrophorese identifiziert worden waren, konnten dann durch die angelegte Ko-Kultur expandiert werden.

Reaktionsansatz:	10x Taq-Polymerase Reaktionspuffer	2 µl
	50mM MgCl ₂	1 µl
	dNTP-Mix (10µM)	0,5 µl
	Vorwärts-/Rückwärts- <i>Primer</i>	je 0,05 µl
	Taq-Polymerase	5 Einheiten
	Add Reinst-Wasser	20 µl

Der entsprechende *Thermocycler* wurde wie folgt programmiert:

94°C	5 Minuten	} 28 Zyklen
94°C	30 Sekunden	
T _M (Primer) -5°C	30 Sekunden	
73°C	500 Bp/min	
73°C	10 Minuten	

2.2.2 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau von DNA wurden folgende Agenzien zusammen pipettiert:

DNA	2 µg
BSA	bei Bedarf 0,5 mg/ml
Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	10 Einheiten
Add Reinst-Wasser	20 µl

Der Verdau fand für alle Enzyme, mit Ausnahme von *SfiI* (50°C) bei 37°C statt und dauerte 1h bzw. 18h (*DpnI*).

2.2.3 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Sequenzen ohne Restriktionsüberhänge (*blunt ends*) in das Rückgrat eines entsprechend geschnittenen Vektors erforderte die Dephosphorylierung der Vektorenden. Zu diesem Zweck wurde 1 µg Vektor-DNA mit 10 Einheiten Alkalischer Phosphatase laut Angaben des Herstellers dephosphoryliert (37°C, 1h). Die DNA wurde dann mit Ethanol gefällt. Für eine anschließende Ligation wurden Vektor- und *Insert*-DNA im Massenverhältnis 1:3 mit Ligationspuffer verdünnt und entweder 3h bei RT oder über Nacht bei 15°C ligiert (10 Einheiten Ligase in Anwesenheit von 5% PEG-6000). Für Ligationen mit Restriktionsüberhängen (*sticky ends*) entfiel der Dephosphorylierungsschritt der geschnittenen Vektor-DNA.

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Je nach gewünschtem Auflösungsvermögen wurden 1 - 2% ige (w/v) Agarose-Gele wie folgt hergestellt: die entsprechende Menge Agarose wurde in 0,5x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 40°C wurde Etidiumbromid hinzupipettiert (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) und das Gel in die entsprechende Gelkammer gegossen. Nach Erkalten des Gels inklusive anschließender Beladung der Geltaschen mit DNA und Ladepuffer erfolgte die DNA-Auftrennung im elektrischen Feld bei max. 5V/cm Elektrodenabstand. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

2.2.5 Transformation von DNA in kompetente *E.coli* Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden langsam auf Eis für ca. 20 Minuten aufgetaut und anschließend entweder mit 10 ng gereinigter DNA oder mit 10 µl eines hitzeinaktivierten Ligationsansatzes vermengt. Diese Mischung wurde nun für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock der Bakterien-DNA-Lösung für 42 Sekunden bei 42°C. Sofort danach wurde 1 ml 37°C warmes LB-Medium zu dem Transformationsansatz pipettiert und dieser bei 37°C für 1 h in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Ausplattierung der transformierten Bakterien auf entsprechenden Selektionsantibiotika – haltigen Agarplatten erfolgte in zwei Konzentrationen. 200 µl des originalen – oder 200 µl des durch Zentrifugation (1 Minute, 2000 rpm) aufkonzentrierten Transformationsansatzes wurden mit einer sterilen Glaspipette gleichmäßig auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert.

2.2.6 Mutagenese von *nst*

Die Mutagenese von *nst* erfolgte in dem Subklonierungsvektor pUC18-HA, welcher hinter der multiplen Klonierungssequenz (*mcs*, *multiple cloning site*) ein Hämagglutinin-Epitop kodiert.

Humanes *nst* wurde mit Hilfe folgender *Primer* aus einer cDNA-Bibliothek amplifiziert: Vorwärts-*Primer*: 5'-GCC ACC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG-3', Rückwärts-*Primer*: 5'-CAC ATA ATC TGT ACT GAA GTC-3'. Dieses Amplifikat wurde dann in einen *EcoRV* verdauten pUC18-HA Vektor einkloniert. Das *nst*-Wildtyp-Gen wird im Folgenden mit B1 abgekürzt.

Die Mutante B2 entstand durch einen Doppelverdau von pUC18-B1-HA mit den Enzymen *MscI* und *BstEII*. Anschließend wurden überhängende Nukleotidenden durch das Enzym T4-Polymerase aufgefüllt und der Vektor religiert. Zur Deletion der I-Domäne (Mutante B3) wurde pUC18-B1-HA mit den Enzymen *NcoI* und *Bsp120I* verdaut, Nukleotidüberhänge durch eine T4-Polymerase-Auffüllreaktion beseitigt und der Vektor wieder religiert. Die Mutante B4 entstand durch einen sequenziellen Verdau mit den Enzymen *Bsu36I*, *NgoMIV* und *NcoI*. Dazu wurde zuerst die basische und *Coiled Coil* Domäne mit Hilfe der Enzyme *NgoMIV* und *Bsu36I* aus dem Vektor herausgeschnitten und mittels Gelelektrophorese isoliert. Ein weiterer pUC-18-B1-HA Vektor wurde mit den Enzymen *NgoMIV* und *NcoI* geschnitten, wodurch die basische-, *Coiled Coil*-, G4- und G1-Domäne aus

diesem Vektor entfernt wurde. Durch anschließendes Auffüllen der Nukleotidüberhänge der *NcoI*-Schnittstelle war eine Ligation des *NgoMIV-Bsu36I* Fragments mit dem präparierten Vektor möglich. Somit entstand ein pUC18-HA Vektor mit einem *nst*- Gen, welches keine G1- und G4-Domäne mehr enthielt. Die Mutante B5 wurde durch einen *AvrII* - *NgoMIV* Doppelrestriktionsverdau generiert. Das dadurch deletierte Startkodon wurde durch eine Ligation mit einem ATG-haltigen N-terminalen Deletionslinker mit den Sequenzen 5'- CTA GCC ACC ATG GTG GCA TAG-3' und 5'- CCG GCT ATG CCA CCA TGG TGG-3' ersetzt. Die Mutante B6 wurde mit Hilfe folgender PCR-Primer hergestellt: Vorwärts-Primer : 5'-GCC ACC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG-3'. Rückwärts-Primer: 5'- CTC GAT GGT AAC CCT CCT TTT CCA TAG GTT CCA C-3'; Eine *site directed mutagenesis* PCR-Reaktion ermöglichte die Herstellung der Mutanten B7, B8 und B9. Dafür wurden folgende Primer verwendet:

B7: 5'-GGT TTC CCA AAT GTG GCA GCA GCT AGC ATT ATC AAT AGC-3', 5'-GCT ATT GAT AAT GCT AGC TGC TGC CAC ATT TGG GAA ACC-3'

B8: 5'-GTT GGA GTA ATT GGT TTC GGT AAC GTG GGG AAA AGC AGC-3', 5'-GCT GCT TTT CCC CAC GTT AAC GAA ACC AAT TAC TCC AAC-3

B9: 5'-CTG GTA CTT ATA TTA AAT GCA TCA CTT CTG GTA CCA AAG GAG-3' und 5'-CTC CTT TGG TAC CAG AAG TGA TGC ATT TAA TAT AAG TAC CAG-3.

Die verkürzte *nst*-Variante B10 wurde ebenfalls mittels einer PCR-Reaktion aus einem pUC18-B1-HA Vektor amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet: Vorwärts-Primer: 5'-GCC ACC ATG ACC TGC CAT AAG CGG -3', Rückwärts-Primer: 5'- CAC ATA ATC TGT ACT GAA GTC-3'. Dieses Amplifikat wurde dann in einen *EcoRV* verdauten pUC18-HA Vektor einkloniert. Für die Herstellung der Mutanten B3-7, B3-8 und B3-9 wurde der pUC18-B3-HA Vektor verwendet, in welchen mittels *site directed mutagenesis* PCR Reaktion die einzelnen Punktmutationen der Mutanten B7, B8 und B9 eingefügt wurden (Primer: siehe Herstellung der Mutante B7, B8, B9).

(Die Klonierung der Mutanten B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 und B9 wurden von Dr. Holzel durchgeführt. Die Mutanten B10, B3-7, B3-8 und B3-9 wurden selbst kloniert.)

A

Domäne/Motiv	Basenpaare	Aminosäuren
Wildtyp	1650	550
Basisch	4-138	2-47
Coiled Coil (CC)	181-261	60-88
G4	529-540	178-182
G1	766-789	261-269
Intermediate(I)	846-1368	282-456
Sauer	1378-1509	459-503
G5	444-459	148-153
G2	861-867	287-289
G3	915-924	305-308

B

Name der Mutante	Größe (Bp)	Größe (AS)	Größe (kDa) c.a
B1	1650	549	60,5
B2	1345	448	49,3
B3	1172	390	42,9
B4	1266	421	46,3
B5	1518	505	55,6
B6	333	111	12,2
B7	1650	550	60,4
B8	1650	550	60,4
B9	1650	550	60,4
B10	1613	537	59,1
B3-7	1172	390	42,9
B3-8	1172	390	42,9
B3-9	1172	390	42,9

Tabelle 1 Domänenstruktur und Größe der Mutanten von *nst* in Basenpaaren, Aminosäuren und Dalton

(A) Größe und Lage der *nst* Domänen in Basenpaaren und Aminosäuren. Die Reihenfolge der Domänen/Motive entspricht der Chronologie ihrer Identifizierung. (B) Die Tabelle beschreibt die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Gengröße (Basenpaarangabe) bzw. auf die Proteingröße (AS-Anzahl bzw. Molekulargewicht (kDa)).

2.2.7 Umklonierungen der *nst*-Mutanten in pRTS-1 Expressionsplasmide

Alle *nst* Mutanten wurden aus dem pUC18-HA Subklonierungsvektor in pRTS-1 Expressionsplasmide umkloniert. Dazu wurden beide Vektoren mit dem *Sfi*I Enzym verdaut. Der Restriktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

2 µg DNA (pUC18 oder pRTS-1)
5 µl NEB2 Restriktionspuffer
1 µl BSA
*Sfi*I (3 Einheiten)
add 50 µl Reinst-Wasser
1 Tropfen G400 Öl

Dieser Restriktionsansatz wurde zwecks Verdunstungsgefahr mit Öl überschichtet und über Nacht bei 50°C im Heizblock inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung des Ansatzes durch eine Agarose-Gel-Elution (MinElute, Qiagen). Es folgte eine Standardligation der Inserts in den geschnittenen pRTS-1 Vektor mit daran anschließender Transformation in den *E.coli*-Stamm DH10B. Die richtige Orientierung der Sequenzen im pRTS-1 Vektor wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion überprüft. Dabei wurde ein *nst* spezifischer Vorwärts-Primer (*nst*-fwd: 5'-GCC ACC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG-3' und ein pRTS-1 spezifischer Rückwärts-Primer (pRTS-1_*Sfi*I+55bp: 5'- AAT CAA GGG TCC CCA AAC TC-3') verwendet. Positive *E.coli* Klone wurden expandiert und für eine anschließende DNA-Extraktion lysiert.

2.2.8 Klonierungsstrategie zur Herstellung von miRNA-pRTS-1 Vektoren

Die mit Hilfe des Invitrogen Algorithmus identifizierten miRNAs wurden *in silico* mit spezifischen *Bpi*I- Restriktionsüberhängen versehen und von der Firma metabion international AG synthetisiert. Nach Erhalt wurden die entsprechenden Oligonukleotide in TE-Puffer gelöst, nach Angaben des Herstellers hybridisiert und in einen pMIRTOP-Vektor einkloniert (siehe unten). Dieser Vektor besitzt neben einem CMV-Promotor und einem nachfolgenden *eGFP*-Gen auch die 5'- und 3'- Region der Maus miRNA miR-155. Nach erfolgreicher Einklonierung in dieses Plasmid wurde das *eGFP*-Gen zusammen mit der vollständigen miRNA-

Sequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den konditionalen, episomalen pRTS-1 Vektor umkloniert. Dieser exprimiert nach Induktion mit Doxycyclin ko-cistronisch die miRNA und das *eGFP*-Gen.

2.2.9 Klonierung in den pMIRTOP-Vektor

Der pMIRTOP-Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *BpiI* für 1h bei 37°C verdaut und mittels Ethanolfällung aufgereinigt. In dieses Vektor-Rückgrat wurde ein entsprechendes miRNA-Insert unter Standard-Ligationsbedingungen einkloniert und Insert-negative Konstrukte durch einen Nachverdau des Ligationsansatzes mit *BpiI* eliminiert. Es folgte die Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym (20 Minuten; 65°C). Die Transformation in chemokompetente Bakterien (DH10B-Stamm) erfolgte nach einem Standard-Protokoll (siehe auch 2.2.5). Positive Klone auf einer Kanamycin-Agarplatte wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion identifiziert. Dazu wurde ein CMV-Promotor Vorwärts-Primer und ein miR-155 spezifischer Rückwärts-Primer verwendet (siehe Material).

PCR-Reaktionsbedingungen :	94°C	10 min	} 28 Zyklen
	94°C	15 sec	
	54°C	30 sec	
	72°C	1,4 min	
	72°C	10 min	

2.2.10 pMIRTOP-pRTS-1 Umklonierungen

Rekombinante pMIRTOP-Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco47III* und *BglII* für 1h im Fermentas-Puffer O bei 37°C verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein 1 kB großes Insert wurde aus dem Gel mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kits* (Qiagen) isoliert und in einen mit *BglII* und *SwaI* vorverdauten pRTS-1 Vektor unter Standard-Ligationsbedingungen einkloniert (1h, 37°C, Restriktionspuffer O, Fermentas). Der Ligationsansatz wurde nach der Ligation mit dem Restriktionsenzym *SwaI* verdaut, um religierte pRTS-1 Vektoren ohne Insert zu eliminieren (1h, 37°C). Diese DNA wurden dann in chemokompetente *E.coli* Bakterien (DH10B-Stamm) transformiert und die rekombinanten Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Positive Bakterienklone wurden mit Hilfe einer PCR-Reaktion

identifiziert: ein Vorwärts-*Primer* bindet in der Haarnadel-Sequenz des miRNA-Rückgrats, der Rückwärts-*Primer* ist komplementär zu 21 Basenpaaren des OriP-Gens von pRTS-1.

PCR- Reaktionsbedingungen :	94°C	10 min	} 28 Zyklen
	94°C	15 sec	
	53°C	30 sec	
	72°C	1,8 min	
	72°C	10 min	

2.2.11 Kultivierung von humanen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in DMEM-Medium inkubiert, welches mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin supplementiert wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 8% CO₂ in einem Inkubator. Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von max. 90% expandiert und anschließend im Verhältnis 1:3 – 1:10 gesplittet. Dazu wurden adhärenente Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 5-8 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt.

Zur Vorbeugung einer Mykoplasmen-Kontamination wurden die laufenden Zellkulturen regelmäßig einer mindestens 10 –tägigen Behandlung mit den Antibiotika Sparfloxacin (1 µg/ml) oder Ciprofloxacin (1 µg/ml) unterzogen. Vor der Durchführung von Experimenten oder Transfektionen wurde auf die Verwendung dieser beiden Antibiotika verzichtet.

2.2.12 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden entsprechend trypsinierte Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 4 Minuten, 1200 g) und dann in 1 ml Kryokonservierungsmedium (enthält 20% DMSO, 40% FCS, 40% DMEM) überführt. Diese Zellsuspension wurde dann langsam in Kryokonservierungsröhrchen einpipettiert. Diese Röhrchen wurden dann in einen mit Isopropanol gefüllten Kryokonservierungstank transferiert, welcher eine schrittweise Herabkühlung der Zellsuspension in einem –80°C kalten Gefrierschrank sicherstellte. 24h nach einer -80°C Inkubation der Zellen wurde

das Kryokonservierungsröhrchen in einen Stickstofftank zum Zwecke der Langzeitlagerung überführt. Zum Auftauen von kryokonservierten Zellen wurden diese so schnell wie möglich in einem 37°C Wasserbad erwärmt und anschließend vorsichtig in vorgewärmten DMEM-Medium resuspendiert. Um das toxische DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen (4 Minuten, 1200 g). Es folgte eine Ausplattierung der Zellen in Zellkulturschalen, in denen dann eine mindestens 3 tägige Inkubation in 20% FCS-haltigem DMEM-Medium stattfand. Nach Überprüfung der Viabilität mittels Trypanblau-Färbung wurden die Zellen für Experimente verwendet.

2.2.13 Bestimmung des Zelltiters und der Viabilität einer Zellkultur

Trypanblaufärbung und visuelle Zellzahlbestimmung

Zur visuellen Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl einer resuspendierten Zellsuspension mit 20 µl einer Trypanblaulösung (w=0,1%) für 30 Sekunden inkubiert und anschließend in eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer einpipettiert. Nach der visuellen Ausschlussfärbung (tote Zellen werden blau angefärbt) wurde zum einen die Gesamtzellzahl (= Mittelwert aus gezählten Quadruplikaten, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (10^4) und dem Volumen der Zellsuspension), als auch die Lebendzellzahl (nur nicht-blaue Zellen werden gezählt) bestimmt. Der Quotient aus beiden Werten gibt Aufschluss über die Viabilität der vorliegenden Zellen.

Elektrische Zellzahlbestimmung mit einem Partikelzählgerät (Coulter Counter®)

Zur elektrischen Bestimmung der Zellzahl nach dem Coulter Prinzip wurden 100 µl einer resuspendierten Zellsuspension mit 10 ml einer Coulter ISOTON® Lösung gemischt. In entsprechenden Küvetten erfolgte dann die elektrische Messung der Partikelanzahl in Triplikaten. Nach jeder Messung wurde die Apparatur mit Coulter ISOTON® Lösung gespült. Der Coulter Counter® wurde zuvor mit Hilfe von visuell ermittelten Zellzahlen auf die entsprechenden Zelllinien geeicht: dazu wurde der Parameter „Zelldurchmesser“ für jede Zelllinie optimiert und in das Partikelzählgerät eingegeben.

Zelllinie	Coulter Counter® Durchmesser
U2OS	8 µm
H1299	7 µm
2fTGH	8 µm
HCT116	5 µm

Tabelle 2 Durchmesser der einzelnen Zelllinien für eine Coulter Counter® Messung

Wird der Coulter Counter® auf diese Zelldurchmesser Werte geeicht, so entsprechen die visuell ermittelten Zellzahlen den Coulter Counter® Messwerten.

2.2.14 Transfektion von DNA in humane Zellen

Die Transfektion von DNA in humane Zellen erfolgte mit dem Lipid-basierten Transfektionsreagenz PolyFect®. Dazu wurden 100 000 Zellen/6-well am Vortag der Transfektion ausplattiert und über Nacht bis zu einer Konfluenz von ca. 50% expandiert. Dann erfolgte die Herstellung einer Transfektionsmischung, bestehend aus 2 µg DNA und 5 µl resuspendiertem PolyFect® in 100 µl serumfreien Opti-MEM®-Medium. Die Komplexbildung aus DNA und PolyFect® vollzog sich während einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei RT und wurde anschließend durch Verdünnung des Transfektionsansatzes mit 900 µl Opti-MEM®-Medium gestoppt. Nachdem entsprechend zu transfizierende Zellen mit Opti-MEM®-Medium präinkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von 1 ml Transfektionsansatz/6-well. Die Zellen wurden dann für 4-5h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der Austausch des Transfektionsmediums durch Standard-Vollmedium. Nach 24h schloss sich entweder ein entsprechendes Experiment an (= transient transfizierte Zellen) oder die Zellen wurden einer Antibiotika-Selektion unterzogen (=stabile Zelllinie). Die Transfektionseffizienz wurde mikroskopisch mit Hilfe von eGFP-Fluoreszenzsignalen, welche von einem kotransfizierten eGFP-N1 Reporterkonstrukt stammen, überprüft.

2.2.15 Selektion von transient transfizierten Zellen

Nachdem die transient transfizierten Zellen für 24h in Vollmedium inkubiert wurden, erfolgte der Selektionsbeginn mit entsprechenden Antibiotika supplementierten Medien. Alle Zelllinien wurden entweder mit Hygromycin (200 µg/ml), Puromycin (1 µg/ml) oder mit beiden Antibiotika selektiert. Die Dauer der Selektion unterschied sich von Zelllinie zu Zelllinie. Generell wurden Zellen nach

Selektionsbeginn für ca. 7 Tage expandiert und anschließend in das nächst höhere Petrischalenformat übertragen. Erreichte diese Zellkultur eine Konfluenz von ca. 90%, erfolgte eine Verdünnung der Zellkonzentration im Verhältnis 1:10. Letzteres diente zur Ausdünnung von ruhenden, nicht proliferierenden Zellen, die somit auch nicht positiv selektiert werden konnten.

Um eine präexistierende Resistenz der Zellen gegen die Antibiotika auszuschließen, wurde eine Reporterzelllinie (transient transfizierter eGFP-N1 Vektor, welcher eine Neomycin-Resistenz vermittelt) ebenfalls mit Hygromycin bzw. Puromycin supplementiertem Medium inkubiert. Das Absterben dieser Zelllinie deutete somit auf eine Antibiotika-Sensitivität hin. Nachdem stabil selektierte Zellen eine Konfluenz von ca. 75% erreichten, wurden sie für entsprechende Experimente verwendet.

2.2.16 Induktion von stabilen, konditionalen Zelllinien

Die Induktion von stabilen pRTS-1 Zelllinien erfolgte mit dem Antibiotikum Doxycyclin. Zu Beginn der Promotionsarbeit wurde dabei eine Konzentration von 1 µg /ml Medium verwendet, was aber insbesondere bei stabilen U2OS-Zelllinien in einer extremen Proliferationsverlangsamung resultierte. Nach einer Titration der Doxycyclin-Konzentration stellte sich schließlich eine 10-fach geringere Konzentration von 100 ng/ml als genauso effizient im Hinblick auf die induzierte Protein-Expressionsstärke heraus.

pRTS-1-Zelllinien zeigen 24h nach Induktion bereits deutlich detektierbare eGFP-Fluoreszenzsignale, welche mikroskopisch oder via Durchflusszytometrie überprüft wurden. Für *knock-down knock-in* Experimente wurde die Induktionsdauer jedoch auf 72h ausgeweitet, um eine entsprechend hohe, intrazelluläre Proteinmenge von *nst* oder seiner Mutanten vor dem eigentlichen siRNA *knock-down* zu gewährleisten.

Die Induktion der pRTS-Vektoren während der Durchführung des *knock-down knock-in* Experimente wurde durch Doxycyclin-Supplementierung des Post-siRNA-Transfektionsmediums gewährleistet. Jedoch wurde diesem Medium kein Hygromycin oder Puromycin zugefügt. Eine Verwendung aller 3 Antibiotika nach der siRNA Transfektion resultiert in einer reduzierten Viabilität der Zellen und einer erhöhten Apoptose-Rate.

2.2.17 siRNA- und miRNA- Design

siRNA Design

siRNA Zielsequenzen wurden manuell mit Hilfe von Suchalgorithmen identifiziert. Dazu wurde die *nst* mRNA Referenzsequenz (lange mRNA Form, inkl. Exon1; NM_014366.4) in die Suchmaske des Dharmacon Suchalgorithmus (<http://www.dharmacon.com/HomePage.aspx/siRNAdesigncenter>) eingegeben und mit den entsprechenden Standard-Sucheinstellungen (GC-Gehalt: 30-64%; zusätzliche BLASTn-Überprüfung in einer humanen Datenbank) eine siRNA-Zielsequenzsuche gestartet.

Matrizenstrang - Sequenz	Position (Bp)	Region	GC (%)	<i>knock-down</i> Wahrscheinlichkeit (%)
5` - AAGAACTAAAACAGCAGCA-3`	389	ORF	49	78
5` -GTATGCATGAGCTGTGTAA-3`	1901	3` UTR	42	74
5` -TGCATGAGCTGTGTAAATT-3`	1904	3` UTR	37	65
5` -GGTATGCATGAGCTGTGTA-3`	1900	3` UTR	47	61

Tabelle 3 siRNA-Zielsequenzen im offenen Leseraster und 3`UTR-Bereich der *nst* mRNA, identifiziert vom Dharmacon Suchalgorithmus.

Dargestellt ist die Zielsequenz, die genaue Lage der Zielsequenz in der mRNA (ORF= *open reading frame*; UTR = untranslatierter Bereich), ihr GC-Gehalt und die Wahrscheinlichkeit (in %) für einen erfolgreichen *knock-down*.

Ein Ergebnis dieser Standardsuche war die von Tsai und McKay beschriebene Zielsequenz, die sich im offenen Leseraster der *nst* mRNA befindet. Eine Zielsequenz im annotierten, untranslatierten Bereich dieser mRNA konnte jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht identifiziert werden. Um dennoch eine Zielsequenz zu erhalten, wurde nicht die gesamte mRNA von *nst*, sondern nur die Nukleotidsequenz des jeweiligen UTR- Bereiches auf potenzielle Zielsequenzen hin untersucht. Wieder blieb die Suche im 5`UTR Bereich ergebnislos. Allerdings konnten im 3`UTR Bereich der mRNA drei siRNA Zielsequenzen identifiziert werden. Aus den entsprechenden BLAST-Ergebnissen war ersichtlich, dass diese Zielsequenzen ausschließlich im *nst* Gen vorkommen und somit für einen spezifischen *knock-down* dieses Gens geeignet waren. Alle gefundenen Zielsequenzen wurden auf die Präsenz von toxisch wirkenden RNA-Motiven (wie z.B. UGGC-Subsequenz) überprüft (Fedorov et al., 2005).

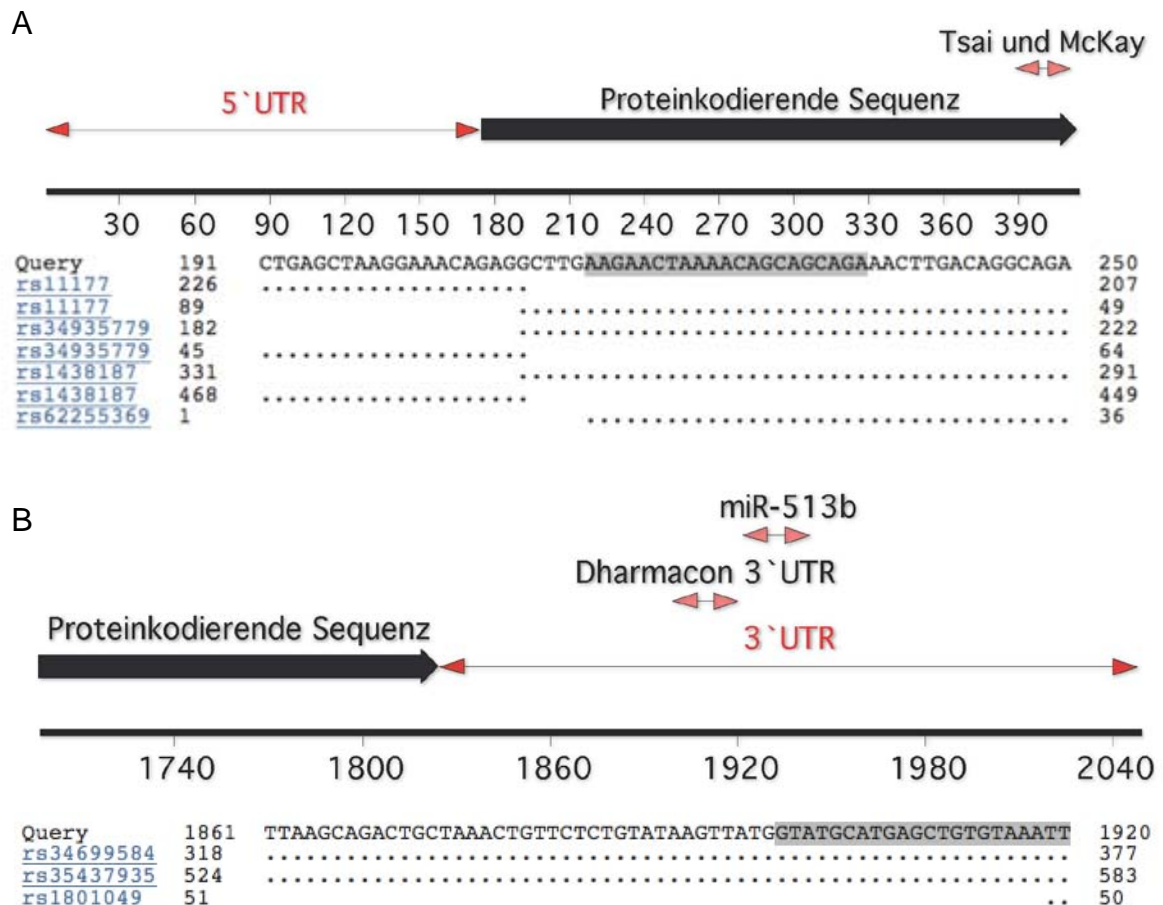


Abbildung 4 siRNA-Zielsequenzen in der *nst* mRNA, welche keine Sequenzpolymorphismen und miRNA Zielsequenzen enthalten.

(A) Dargestellt ist die *nst* mRNA mit ihrem 175 Basenpaare umfassenden 5'UTR Bereich und einem Teil der proteinkodierenden Sequenz. Die siRNA Zielsequenz, die von Tsai und McKay identifiziert wurde, hat die Sequenz 5'-AAGAACTAAAACAGCAGCAGA-3' und beginnt an der Position 389 der mRNA. Eine SNP-BLAST-Suche ergab keine bekannten Nukleotidpolymorphismen im humanen Genom. Punkte deuten eine Übereinstimmung der angefragten Sequenz (Query) mit der entsprechenden Contig-Bibliothek (blaue Schriftfarbe) an. (B) Die vom Suchalgorithmus der Firma Dharmacon, Inc. identifizierte siRNA Zielsequenz im 3'UTR Bereich der mRNA hat die Sequenz 5'-GTATGCATGAGCTGGTAAATT-3' und beginnt an der Position 1900 der mRNA. Die endogene miRNA miR-513b bindet in direkter Nachbarschaft, ist aber nicht Bestandteil der siRNA Zielsequenz. Auch für diese Zielsequenz sind keine humanen Nukleotidpolymorphismen bekannt.

Auch wurde mit Hilfe eines speziellen BLAST Algorithmus (BLASTn-SNP) sichergestellt, dass in den entsprechenden Zielsequenzen keine Nukleotidpolymorphismen (SNPs) vorkommen, die eine spezifischen Erkennung der Zielsequenz verhindern könnte (BLASTn unter Verwendung der SNP-Datenbank human_9606; Abbildung 4). Des Weiteren galt es, eine Interferenz

der siRNA Zielsequenzen mit dem micro-RNA (miRNA) Genregulationsweg auszuschließen. Ist eine siRNA Zielsequenz Bestandteil einer miRNA Zielsequenz, so steigt die Wahrscheinlichkeit für so genannte *off-target* Effekte (Gen-unspezifische Effekte) dramatisch an. Der Grund liegt im redundanten Vorkommen von miRNA Zielsequenzen im 3'UTR Bereich verschiedenster Gruppen von mRNAs. Der 3' UTR Bereich von *nst* wurde deshalb mit dem freizugänglichen Algorithmus TargetScanHuman (Version 5.0) auf mögliche miRNA Zielsequenzen hin überprüft. Tatsächlich befindet sich die Zielsequenz der endogenen miRNA miR-513b in der 3'UTR – Nukleotidsequenz von *nst*. Sie ist jedoch nicht Bestandteil der identifizierten siRNA Zielsequenz.

miRNA Design

Um eine miRNA Zielsequenz im untranslatierten Bereich der *nst* mRNA zu identifizieren, wurde die *nst* mRNA Referenzsequenz in den Suchalgorithmus der Firma Invitrogen eingegeben und eine Zielsequenzsuche unter Standardbedingungen durchgeführt (35-55% GC-Gehalt; BLASTn in humaner Datenbank; <http://rnaideigner.invitrogen.com/rnaiexpress/setOption>).

Matrizenstrang- Sequenz	Position (bp)	Region	GC (%)	<i>knock-down</i> Wahrscheinlichkeit
5'-CGTCAGTGGCTTCAGTTCACA-3'	100	5'UTR	52.39	*****
5'-CGGAGGCAGGTTGATGTGTTT-3'	132	5'UTR	52.39	*****
5'-GGAGGCAGGTTGATGTGTTTG-3'	133	5'UTR	52.39	*****

Tabelle 4 miRNA-Zielsequenzen im 5'UTR-Bereich der *nst* mRNA, identifiziert vom Invitrogen miRNA Suchalgorithmus.

Dargestellt ist die Zielsequenz, die genaue Lage der Zielsequenz in der mRNA (UTR= untranslatierter Bereich), ihr GC-Gehalt und die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen *knock-down*, basierend auf einer 5 Sterne Skala. (5 Sterne bedeuten laut Invitrogen: die vorgeschlagene Zielsequenz erfüllt alle Bedingungen für einen hocheffizienten *knock-down*. Die *knock-down* Wahrscheinlichkeit beträgt mehr als 70%).

Diejenigen Zielsequenzen im untranslatierten mRNA – Bereich, mit der höchsten *knock-down* Wahrscheinlichkeit (angedeutet durch eine 5 Sterne Bewertung) wurden ausgewählt und *in silico* der miRNA Struktur der Maus miRNA miR-155 angepasst. Der Sequenz wurden zusätzliche, entsprechend notwendige Restriktionsüberhänge für eine Einklonierung in den pMIRTOP Vektor

hinzugefügt. Die Synthese erfolgte durch die Firma metabion international AG, München. Ein initiales *knock-down* Experiment identifizierte die miRNA gegen die erste Zielsequenz aus Tabelle 4, als diejenige, welche die stärkste Herabregulation des NST-Proteins verursachen konnte.

2.2.18 siRNA Transfektion in humane Zellen

Am Tag vor der siRNA Transfektion wurden 70 000 Zellen möglichst gleichmäßig in einem 6-well ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde dann das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmten, serumfreien Opti-MEM®-Medium präinkubiert. Währenddessen erfolgte die Herstellung der Transfektionslösung. Dazu wurde ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß mit 150 µl Opti-MEM®-Medium beschickt und 4 µl resuspendiertes Oligofectamine™ Transfektionsreagenz hinzugegeben. Diese Lösung wurde leicht gemixt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. In ein weiteres Eppendorf-Gefäß, welches ebenfalls 150 µl Opti-MEM®-Medium enthielt, wurden 3 µl einer siRNA-Stammlösung (20µM) mit RNase freien Pipettenspitzen einpipettiert und durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren leicht gemischt. Diese Lösung wurde ebenfalls für 10 Minuten bei RT inkubiert. Eine Vereinigung beider Lösungen mit anschließender 20 minütiger Inkubation resultierte in der Ausbildung von Transfektionspartikel. Diese Reaktion wurde dann durch Zugabe von 700 µl Opti-MEM®-Medium gestoppt. Nach Aspiration des Präinkubationsmediums erfolgte die siRNA-Transfektion durch Zugabe von insgesamt 1ml Transfektionslösung zu den Zellen, welche anschließend für 6h bei 37°C inkubiert wurden. Nach Ende dieser Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich 37°C warmes Vollmedium hinzugegeben. Um optimale Ergebnisse bezüglich der *knock-down* Effizienz zu erhalten, wurde die siRNA-Transfektion an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt und entsprechende Lysate erst 48h nach Ende der letzten Transfektion hergestellt.

2.2.19 siRNA-Hybridisierung

Die siRNA-Einzelstränge wurden in einem deprotektierten, lyophilisierten Zustand von den Firmen CureVac® oder Eurofins geliefert. Nach Erhalt wurden die Lyphilisate mit DEPC-Wasser so verdünnt, dass eine Endkonzentration von

100 μM vorlag. Die so erhaltenen Oligonukleotid-Stammlösungen wurden bei -80°C gelagert.

Für eine Hybridisierung der *sense*- und *antisense*-Stränge wurden beide Stammlösungen mittels Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt (Endkonzentration 50 μM) und anschließend vereinigt. Es folgte eine weitere Verdünnung mit Hybridisierungspuffer bis zu einer finalen Konzentration von 20 μM . Anschließend wurde diese Hybridisierungsstocklösung aliquotiert und für 1 Minute auf 90°C im Heizblock erhitzt. Um Schwankungen der Puffer-Salzkonzentration durch Wasserverdunstung zu vermeiden, wurde eine Gefäß-Deckelheizung verwendet. Es folgte eine Abkühlung der erhitzten Aliquote auf RT in einem Zeitraum von ca. 6-8h. Schließlich wurden die siRNA bei -80°C gelagert und nicht mehr als fünf Mal aufgetaut bzw. eingefroren.

2.2.20 Knock-down knock-in Experimente

siRNA basierte knock-down knock-in Prozedur

Stabile pRTS-Zelllinien, welche *nst* oder seine Mutanten konditional exprimieren konnten, wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet und in Anwesenheit von Doxycyclin (100 ng/ml) und den Selektionsantibiotika (Hygromycin/Puromycin) ausplattiert. Diese Induktionsphase dauerte 72h und wurde mikroskopisch anhand des koexprimierten eGFP-Protein kontrolliert. Es folgte die Ausplattierung von 70 000 Zellen/6-well, wobei pro Zelllinie jeweils zwei 6-wells für die RNA-Extraktion und je ein 6-well für entsprechende Proteinlysate verwendet wurden. Am nächsten Tag erfolgte die erste siRNA-Transfektion für 6h nach dem Standardprotokoll (siehe oben). Nach Entfernung der siRNA-Transfektionslösung und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer, wurden die Zellen über Nacht in DMEM-Medium inkubiert, welches nur Doxycyclin, nicht aber die Selektionsantibiotika Hygromycin oder Puromycin enthielt. Am darauffolgenden Tag wurde die zweite siRNA Transfektion durchgeführt. 24h später wurden die Zellen wieder mikroskopisch auf ihre eGFP-Expression hin überprüft. Am nächsten Tag wurden entsprechende Proteinlysate hergestellt, bzw. die zelluläre RNA radioaktiv markiert.

miRNA/siRNA basierte *knock-down knock-in* Prozedur

Stabile pRTS-Zelllinien, welche *nst* oder seine Mutanten und eine *nst* spezifische miRNA konditional exprimieren konnten, wurden mit Doxycyclin für 5 Tage induziert. Anschließend wurden die Zellen für eine siRNA-Transfektion ausplattiert (siehe oben). Aufgrund der langsamen Proliferationsgeschwindigkeit der doppelt-selektionierten Zellen nach Doxycyclin-Induktion wurden statt 70 000 (siehe 2.2.18) nun 100 000 Zellen/6-well ausplattiert. Die siRNA-Transfektion erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

2.2.21 Radioaktive Pulsmarkierung von zellulärer RNA

Um die zelluläre RNA effizient mit (^{32}P)-Orthophosphat zu markieren, musste zuerst die endogene Phosphatmenge reduziert werden. Dazu wurden die stabilen, konditionalen Zelllinien zuerst mit einem phosphatfreien DMEM-Medium, welches mit 10% dialysiertem FCS und Doxycyclin (100ng/ml) supplementiert war, für eine Stunde gehungert. Dann erfolgte die radioaktive Pulsmarkierung durch eine Inkubation in phosphatfreiem DMEM-Medium/ 10% dialysiertem FCS/ 15 $\mu\text{Ci/ml}$ (^{32}P)-Orthophosphat bei 37°C. Dieses Medium wurde nach 1h aspiriert und durch Vollmedium, welches Doxycyclin enthielt, ersetzt. Nach 4h Inkubationszeit wurde die RNA aus den Zellen mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kit (S-Linie; Peqlab) isoliert. Alle radioaktiven Arbeiten wurden im radioaktiven Sicherheitslabor des Helmholtz-Zentrum München durchgeführt.

2.2.22 RNA-Isolierung mit Hilfe eines Kits

Wie bereits oben beschrieben, erfolgte die Isolierung der radioaktiv markierten RNA mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kit (S-Linie). Dies erfolgte laut Anweisungen des Herstellerprotokolls bis auf folgende Ausnahmen.

Das Lysepuffer-Volumen pro 6-well betrug 175 μl . Es wurden pro Zelllinie immer zwei 6-wells lysiert, um eine ausreichende Menge an RNA zu erhalten. Es erfolgte kein DNase I Verdau. Die RNA-Elution erfolgte nicht mit 100 μl , sondern mit 35 μl DEPC-Wasser. Diese Aufkonzentrierung war für eine anschließende photometrische Messung der RNA notwendig. Das zur Elution verwendete DEPC-Wasser wurde vor seiner Verwendung auf 70°C erwärmt und die RNA-Isolationssäule damit für 5 Minuten inkubiert.

2.2.23 RNA-Isolierung mit Hilfe des TRIzol-Reagenz

Die RNA-Isolierung mit Hilfe des TRIzol-Reagenz TriFast™ (Peglab) erfolgte laut Anweisungen des Herstellerprotokolls bis auf folgende Ausnahmen. Adhärenente Zellen wurden nicht abtrypsinisiert, sondern direkt in der Zellkulturschale nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS-Puffer lysiert. Dazu wurde 1 ml TriFast™ Reagenz direkt in eine mittelgroße Zellkulturschale (Durchmesser 10 cm) pipettiert. Nach Übertragung des Lysates in ein RNase-freies, vorgekühltes Eppendorf-Gefäß erfolgte die Homogenisierung des Lysates durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren durch eine 0,2 mm Injektionsnadel. Zur Fällung der RNA wurde zusätzlich RNase-freies Glykogen verwendet, was die Fällungseffizienz und auch die Sichtbarkeit des Pellets erhöhte. Das Pellet wurde in DEPC-Wasser gelöst und für 3 Minuten auf 55°C in einem Thermoschüttler erwärmt. Danach wurde das RNA-Lysat bei -80°C eingefroren.

2.2.24 Photometrische Quantifizierung der isolierten RNA

Die Quantifizierung der RNA diente zum einen der Abschätzung ihres Reinheitsgrades, zum anderen konnte später ein denaturierendes RNA-Agarose-Gel mit einer identischen Menge an RNA/Spur beladen werden.

Dazu wurden 2 µl der radioaktiven RNA in 98 µl TE-Puffer einpipettiert und vermengt. In einer entsprechenden UV-Licht durchlässigen Einmal-Küvette erfolgte die photometrische OD-260-Messung mit Hilfe des Biophotometers 6131 (Eppendorf, Hamburg). Dabei wurde darauf geachtet, dass die OD-Werte im linearen Messbereich des Photometers blieben. Das Photometer wurde zuvor auf die optische Dichte des TE-Puffers geeicht. Der schwach radioaktive TE-Puffer und die Messküvetten wurden gesondert entsorgt.

2.2.25 Gelelektrophorese der radioaktiven RNA

Bevor eine entsprechende RNA-Gelelektrophorese gestartet werden konnte, mussten die entsprechenden RNA-Gelproben bezüglich ihrer Menge angepasst und mit einem denaturierendem Ladepuffer versehen werden. Dazu wurden jeweils 1 µg an entsprechender RNA, DEPC-Wasser und ein Etidiumbromid-haltiger Ladepuffer so zusammenpipettiert, dass ein Endvolumen von 25 µl vorlag. Diese Gelproben wurden für 15 Minuten im Heizblock auf 55°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Währenddessen wurde ein Formaldehyd-

haltiges Agarose-Gel wie folgt hergestellt: 4 g Agarose wurden in 300 ml vollentsalztem Wasser gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf ca. 45°C abgekühlt. Es wurden dann 40 ml MOPS-Puffer und 67 ml Paraformaldehyd-Lösung (37%) hinzugegeben und mit der Agarose-Lösung vermengt. Schließlich wurde die noch flüssige Lösung in eine entsprechende Gelgussform hineingegossen und mit einem Spurkamm versehen. Sobald das Gel erstarrt und erkaltet war, wurde es in einer Gel-Laufkammer mit den entsprechenden RNA-Proben beladen. Es folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung bei 80V für ca. 6-8h in Anwesenheit von 1x MOPS-Laufpuffer. Danach wurde eine gleichmäßige RNA-Beladung in jeder Spur anhand von UV-induzierter Fluoreszenzemission überprüft und per Photo dokumentiert.

2.2.26 RNA-Geltrocknung

Die Trocknung eines RNA-Gels erfolgte mit Hilfe des Gelrockners Gel *Dryer* 583 (BioRad Laboratories, Hercules, USA). Das RNA-Gel wurde dazu auf ein Whatman-Papier aufgebracht, luftblasenfrei mit einer Saran-Folie überdeckt und unter Vakuumbedingungen bei 80°C für 3h getrocknet. Aufgrund der dabei entstehenden toxischen Paraformaldehyd-Dämpfe wurde diese Prozedur unter einem Digestorium durchgeführt. Bevor eine autoradiographische Detektion der RNA folgen konnte, musste das erhitzte Gel für ca. 1h auf RT abgekühlt werden.

2.2.27 Autoradiographische Detektion von RNA

Die autoradiographische Detektion von zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA erfolgte mit Hilfe einer Expositionskassette. Dazu wurde das erkaltete, getrocknete Gel in eine Expositionskassette (Hypercassette™, Amersham) eingeklebt und einem radiosensitiven Hyperfilm MP (Amersham) oder BioMax MS (Kodak)-Film exponiert. Dieser Film wurde dann entwickelt und eingescannt. Nachdem mehrere Expositionen durchgeführt wurden, wurde das schwach radioaktive Gel gesondert entsorgt und die Expositionskassette mit Hilfe eines Geigerzählers freigemessen.

2.2.28 Herstellung von Protein-Lysaten

Adhärente Zellen wurden zweimal in der Zellkulturschale mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und dann in 95°C heißem 2x Laemmli-Puffer lysiert. Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers wurden die lysierten Zellen gesammelt und in ein

Eppendorf-Gefäß übertragen. Es erfolgte die vollständige Denaturierung der Zellen durch eine Inkubation bei 95°C für 7 Minuten. Anschließend wurden das Lysat auf 4°C abgekühlt und auf Eis sonifiziert (*Output cycle* 4; 5 Klicks). Um grobe Zellbestandteile aus dem Lysat zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 g für 10 Minuten bei 4°C. Die so erhaltenen Lysate wurden dann bei -20°C eingefroren.

2.2.29 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für eine Auftrennung der Lysatproteine nach ihrer gelelektrophoretischen Mobilität wurde ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel, hergestellt. Die Mixtur des Trenngels wurde wie folgt zusammenpipettiert:

Agenzien	8% PAA	10% PAA	15% PAA
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2.6 ml	3.3 ml	5 ml
H ₂ O	2.3 ml	1.6 ml	-
Tris/SDS pH 8.8	5 ml	5 ml	5 ml
10% APS	85 ml	85 ml	85 ml
TEMED	10 ml	10 ml	10 ml

Die Konzentration von Polyacrylamid (=PAA) wurde je nach gewünschtem Auflösungsvermögen des Gels gewählt. Für NST wurde üblicherweise ein 10% Trenngel verwendet. Ein Sammelgel wurde folgender Maßen hergestellt:

Agenzien	4% Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0.5 ml
H ₂ O	1.35 ml
Tris/SDS pH 6.8	1.88 ml
10% APS	22.5 µl
TEMED	5 µl

Vor der Einpipettierung der entsprechenden Lysate in das Sammelgel wurden letztere kurzzeitig auf 95°C erhitzt und zusammen mit einem Molekulargewichtstandard aufgetragen. Es folgte eine Auftrennung der Proteine bei konstanten 160V für mindestens 2h. Um die Stabilität des Gellaufs während der Auftrennung zu gewährleisten, wurde die entsprechende Gellaufkammer

ständig mit 4°C kaltem Wasser gekühlt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die gewünschte Auftrennung des Molekulargewichtsmarkers erreicht wurde.

2.2.30 Western Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines elektrischen Tankblotting-Systems von der Gelmatrix auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel aus seiner Laufapparatur herausgelöst und kurzzeitig im Blottingpuffer geschwenkt. Eingebettet zwischen zwei durchnässten Whatman-Papieren und einer entsprechenden Membran erfolgte dann das Tankblotting des Trenngels im elektrischen Feld (konstante 450 mA, 1,5h, RT). Dabei wurde dieses Blotting-Sandwich so in der Blottingkammer orientiert, dass die negativ geladenen Proteine in der Gelmatrix in Richtung Pluspol und somit in Richtung der Membran wanderten. Nach dem Transfer wurde die Blottingeffizienz und die gleiche Proteinbeladung jeder Spur mit Hilfe einer Ponceau S-Färbung (RT, 2 Minuten) kontrolliert. Nach einer visuellen Inspektion der dadurch sichtbar gemachten Proteinbanden wurde der Farbstoff durch mehrmaliges Waschen der Membran in TBST-Puffer entfernt.

2.2.31 Immundetektion von Proteinen auf einer Western-Blot Membran

Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran mit einer 5%-igen Milchpulver-TBST-Lösung für 1h bei RT inkubiert. Nach einer vollständigen Entfernung dieser Lösung wurde die Membran bei 4°C auf einem Roller über Nacht in einer 5% BSA/TBST-Antikörper-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann eine Stringenzwaschung mit TBST-Puffer für 3 x 5 Minuten durchgeführt. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit einer entsprechenden Sekundärantikörper/5% Milchpulver-TBST-Lösung bei RT auf einem Roller an. Wieder erfolgte eine Stringenzwaschung (3 x 5 Minuten, TBST-Puffer, RT). Jegliche TBST-Puffer-Reste auf der Membran wurden durch mehrmaliges Waschen mit vollentsalztem Wasser entfernt. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte nach dem Chemilumineszenz-Prinzip. Dazu wurden entsprechende ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 vermengt und auf die Membran

pipettiert. Nach einer kurzen Einwirkzeit von ca. 1 Minute wurde überschüssiges ECL-Substrat entfernt und die Membran einem Chemilumineszenz-sensitiven Film in einer Expositions-kassette exponiert (Hyperfilm ECL, Amersham). Dieser Film wurde dann entwickelt und eingescannt. Eine Quantifizierung der Protein-Signale erfolgte bei Bedarf mit dem Software-Programm AIDA-2D *Densitometry*®.

2.2.32 Herstellung eines NST spezifischen Antikörpers

Ein GST-NST-Fusionsprotein wurde in das Bauchfell von Ratten injiziert und nach ca. 8 Wochen eine Fusion der isolierten Ratten-Milzzellen mit einer Myelomzelllinie durchgeführt. Die produzierten Antikörper-haltigen Überstände dieser Hybridomzelllinien wurden dann mit immundetektorischen Methoden (ELISA) auf eine hochspezifische Erkennung des NST-Proteins selektiert. Derjenige Antikörper, der das NST-Protein auf einer Western-Blot Membran am besten erkannte, wurde dann für entsprechende Experimente verwendet.

(Kooperation mit Michaela Rohmoser (AG Eick); Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum München; siehe auch Holzel et al., 2005)

2.2.33 Immunfluoreszenz

6-*well*-Platten wurden mit UV-sterilisierten 24x24 mm Glasplättchen (Menzel) beschickt und etwa 200 000 Zellen/*well* ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Induktion von konditionalen Zelllinien mit Doxycyclin (100 ng/ ml). Nach einer 24h Inkubation wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun folgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (gelöst in PBS, pH= 7,4) inkubiert. Nach Abnahme des Fixierungsagens wurden die fixierten Zellen dreimal für 2-3 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 5 Minuten in einer 0,1% Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Die Zellen wurden dann für 1 Stunde in einer 10% FCS/PBS-Lösung inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Primärantikörper-Inkubation bei 4°C in einer feuchten Kammer. Dabei wurden pro Glasplättchen 100 µl einer 1,5%igen FCS/PBS-Antikörper-Lösung (1:10 Verdünnung des Antikörper-Überstandes) verwendet. Am nächsten Tag erfolgte eine Stringenzwaschung der Zellen (dreimaliges Waschen der Glasplättchen in

einer 0,1 prozentigen Tween20/PBS-Lösung für je 5 Minuten). Nun konnte die Sekundärantikörper-Inkubation durchgeführt werden. Pro Glasplättchen wurden dafür 100 µl einer 1:1000 Verdünnung eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers auf die Glasplättchen pipettiert und für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte wieder eine Stringenzwaschung (3x Waschen der Glasplättchen in einer 0,1 prozentigen Tween20/PBS-Lösung für je 5 Minuten). Anschließend wurde eine DAPI-Färbung der DNA für 2 Minuten durchgeführt (1:20 000 Verdünnung von einer 5 mg/ml DAPI-Stocklösung in PBS). Nach Abnahme der Färbelösung und einem PBS-Waschschritt wurden die Präparate mit *Fluorescent Mounting Medium* (DakoCytomation) überschichtet und auf einem Objektträger fixiert. Die so hergestellten Präparate wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.34 Fluoreszenzmikroskopie

Eine mikroskopische Analyse der entsprechenden Präparate erfolgte mit einem Zeiss Axiovert S200 Mikroskop (100 Watt Quecksilberdampflampe). Es wurden die Ölimmersionsobjektive Zeiss Plan Neofluar 63x/ 1,25 und Zeiss Plan Neofluar 100x/ 1,30 verwendet. Photographische Aufnahmen wurden mit Hilfe einer Hitachi CCD-Kamera mit 6,7 µm Pixelgröße und der Openlab® Software (Version 3.0.8; Improvision) durchgeführt. Des Weiteren konnte mit Hilfe dieser Software eine Einfärbung der aufgenommenen Schwarz-Weiss-Bilder und eine Überlagerung verschiedenster RGB-Kanäle vorgenommen werden.

2.2.35 Immunpräzipitation (IP)

Antikörper-Koppelung an Sepharose-G Beads

20 µl Sepharose-G Beads wurden aus einer Ethanol haltigen Sepharose-G-Stocklösung entnommen und zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden mindestens 500 µl Hybridom-Überstand bzw. 10 µg eines kommerziell erhältlichen Antikörpers zu den Beads hinzugegeben und der komplette Ansatz für mindestens 1,5h bei 4°C rollend inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde anschließend durch drei Waschschritte mit Lysepuffer (ohne Protease-Inhibitoren) entfernt (Zentrifugation: 1 Minute, 6000rpm).

Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden ausschließlich subkonfluente Zellen verwendet, welche am Vortag in großen Zellkulturschalen (Durchmesser 15 cm) ausplattiert wurden.

Die Zelllyse erfolgte nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer unter Verwendung eines NP-40-haltigen, isoosmotischen Lysepuffers und eines sterilen Zellschabers. Nach Übertragung der Lysate in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Gefäß wurde dieses für mindestens 1h auf Eis inkubiert und sporadisch durchmischt. Es folgte eine schonende Lysat-Sonifizierung (5 Klicks, Output cycle 3) auf Eis unter Zuhilfenahme von 50 µg Glasbeads (Durchmesser 425 µm). Grobe Zellbestandteile wurden dann durch Zentrifugation (20 Minuten, 10000g, 4°C) entfernt und das so erhaltene Lysat in Eppendorf-Gefäße übertragen. Von diesem Ausgangslysate einer IP wurde 100 µl abgezweigt und sofort mit 95°C heißem Laemmli-Puffer versehen (sog. *Input*). Das restliche Lysatvolumen wurde auf 20 µl Antikörper-gekoppelte Sepharose G *Beads* pipettiert. Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte bei 4°C unter Zuhilfenahme eines Über-Kopf-Rollers und dauerte maximal 6h. Es folgte eine dreimalige Stringenzwaschung der *Beads* mit jeweils 500 µl Lysepuffer bei 4°C. Die Präzipitate wurden mit Laemmli-Puffer von den *Beads* eluiert (Erwärmung auf 95°C für 6 Minuten).

2.2.36 Sucrose-Gradienten Zentrifugation

Herstellung eines Sucrose-Gradienten

RNAse-freie Sucrose wurde mit DEPC-PBS so verdünnt, dass 5-50% (w/v) Sucrose-Lösungen vorlagen. In ein 4,4 ml PA Röhrchen (DROL Laborgeräte) wurden dann 300 µl CsCl-Lösung (1,4 g/ml) einpipettiert, gefolgt von den Sucrose-Lösungen in absteigender Konzentration. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 1h bei 30 000 rpm im Ti60W Schwenkrotor. Die so erhaltenen, Sucrose-Gradienten wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

Sucrose-Gradienten Zentrifugation

Die präparierten Sucrose-Gradienten wurden einen Tag vor ihrer Verwendung bei 4°C langsam aufgetaut. Des Weiteren wurden ca. 10^7 rekombinante Zellen in

einer großen Zellkulturschale ausplattiert und gleichzeitig mit Doxycyclin (100 ng/ml) induziert. Am nächsten Tag wurden diese Zellen dann dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und direkt in der Zellkulturschale in 1 ml Lysepuffer lysiert und resuspendiert (siehe 2.1.5). Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine schonende Sonifizierung (10 Klicks, Output cycle 3) bei 4°C. Grobe Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation entfernt (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C). Pro Gradient wurden dann ca. 200 µl natives Lysat aufgetragen. Danach erfolgte die Austarierung der Gradienten mit DEPC-Wasser auf 0,02 g genau. Die Gradienten-Zentrifugation wurde bei 30 000 rpm im Vakuum einer 4°C kalten Ultrazentrifuge mit einem Ti60W Schwenkrotor durchgeführt. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte per Pipette: es wurden vorsichtig jeweils 200 µl Fraktionen von der Gradienten-Spitze beginnend abgenommen und sofort mit Laemmli-Puffer bzw. TriFast®-Reagenz versetzt. Diese Fraktionen wurden dann für die gelelektrophoretische Analyse der Proteine oder der RNA benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Die *nst* Mutanten und ihr Phänotyp nach Überexpression

Die Funktion eines Gens lässt sich mit unterschiedlichen Methoden charakterisieren. Dem Genetiker stehen dazu Techniken wie z.B. konstitutiver oder konditionaler *knock-out*, temporärer *knock-down* oder ektopische Überexpression von Mutanten zur Verfügung.

Der konstitutive *knock-out* basiert auf einer gezielten Ausschaltung eines Gens in allen Zellen eines Organismus, führt jedoch bei essenziellen Genen zum Tode des Embryos (Smithies et al., 1985; Capecchi et al., 1980; Evans et al., 1985). Der konditionale *knock-out* hingegen induziert die Inaktivierung eines Gens nur in bestimmten Geweben oder Organen und kann spezifisch in bestimmten Wachstumsphasen eines Tieres hervorgerufen werden. Die temporäre Herabregulation einer mRNA eines Gens mittels RNAi ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchführbar und basiert auf der Einbringung kurzer, doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide in Zellen eines Organismus (Fire et al., 1998). Für die ektopische Überexpression von Mutanten werden zuerst einzelne Domänen oder funktionskodierende Motive des Gens deletiert bzw. mutiert und die entsprechenden Mutanten *in vitro* konstitutiv oder konditional überexprimiert. Alle beschriebenen Methoden erlauben die Funktionscharakterisierung eines Gens durch einen Vergleich von rekombinanten Organismen mit normalen, nicht-manipulierten Individuen.

Die Methode der ektopischen Überexpression von dominant-negativen Mutanten wurde bereits erfolgreich bei der Charakterisierung der rRNA-Prozessierungsgene *pes1* und *wdr12* eingesetzt (Holzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Bestimmte Deletionsmutanten beider Gene erzeugten einen dominant-negativen Phänotyp, der die Beteiligung der entsprechenden Proteine an der Zellproliferationskontrolle und Ribosomenbiogenese offen legte. Somit lag der Schluss nahe, für *nst* ebenfalls Mutanten zu kreieren und ihren Phänotyp nach ektopischer Überexpression zu charakterisieren.

3.1.1 Identifizierung der *nst* Domänenstruktur

Bevor eine Mutationsanalyse durchgeführt wird, sollten alle bereits kartierten und vorhergesagten Domänen und Motive des zu untersuchenden Gens erfasst werden. Im Falle von *nst* war durch die Veröffentlichungen von Tsai und McKay (2002, 2005) zwar der Großteil der Domänen bekannt, jedoch konnten durch eigene Sequenzvergleiche weitere Motive des Proteins identifiziert werden (siehe Abbildung 5, NST-Wildtyp-Protein).

Die Präsenz von zwei GTP-Bindemotiven (G4-(KXDL) und G1-(GXXXXGK(S/T)) Motiv) prädestinieren NST als eine mögliche GTPase. Jedoch fehlen hierfür die für die Superfamilie der GTP-Hydrolasen typischen, GTP-Bindemotive G2 (YAFTT), G3 (DXXG/DXPG) und G5 (EXSAX) (Leipe et al., 2002). Eine manuell durchgeführte Sequenzmotivsuche mit dem Software-Programm MacVector® ergab, dass NST durchaus alle, die für eine GTP- Hydrolase typischen GTP-Bindemotive enthält. Allerdings entspricht die Reihenfolge dieser Motive nicht der klassischen, linearen G1-G2-G3-G4-G5 Abfolge, sondern es liegt eine G5-G4-G1-G2-G3 Sequenz in dem Protein vor.

3.1.2 Klonierung von *nst* Punkt- und Deletionsmutanten in ein konditionales Vektorsystem

Grundlage einer systematischen Mutationsanalyse von *nst* bildet die Domänenstruktur des Proteins. Beginnend am C-Terminus des Proteins wurde zuerst die saure Domäne (Abbildung 5, Mutante B2), bzw. der größte Teil der I-Domäne deletiert (Mutante B3). In der Mutante B4 wurden die für GTP-Bindung essenziellen G1- und G4- Motive entfernt. Des Weiteren wurde der basische Aminosäurebereich am N-Terminus des Proteins deletiert (Mutante B5), gefolgt von einer Mutante, die lediglich aus dem basischen AS-Bereich mit daran anschließender *Coiled Coil* Domäne besteht (Mutante B6). Neben einer vollständigen Deletion der Motive G1 und G4 wurden letztere auch mit Punktmutationen versehen: einzelne, stark konservierte Aminosäuren der beiden Motive wurden durch chemisch ähnliche Aminosäuren ausgetauscht (Mutante B7, B8, B9). Tsai und McKay publizierten 2005 eine *nst* Mutante bestehend aus einer Deletion der I-Domäne und einer Punktmutation im G1 GTP-Bindemotiv. Diese Doppelmutationsstrategie wurde auch auf alle Punktmutanten angewandt, wodurch die Mutanten B3-7, B3-8 und B3-9 entstanden.

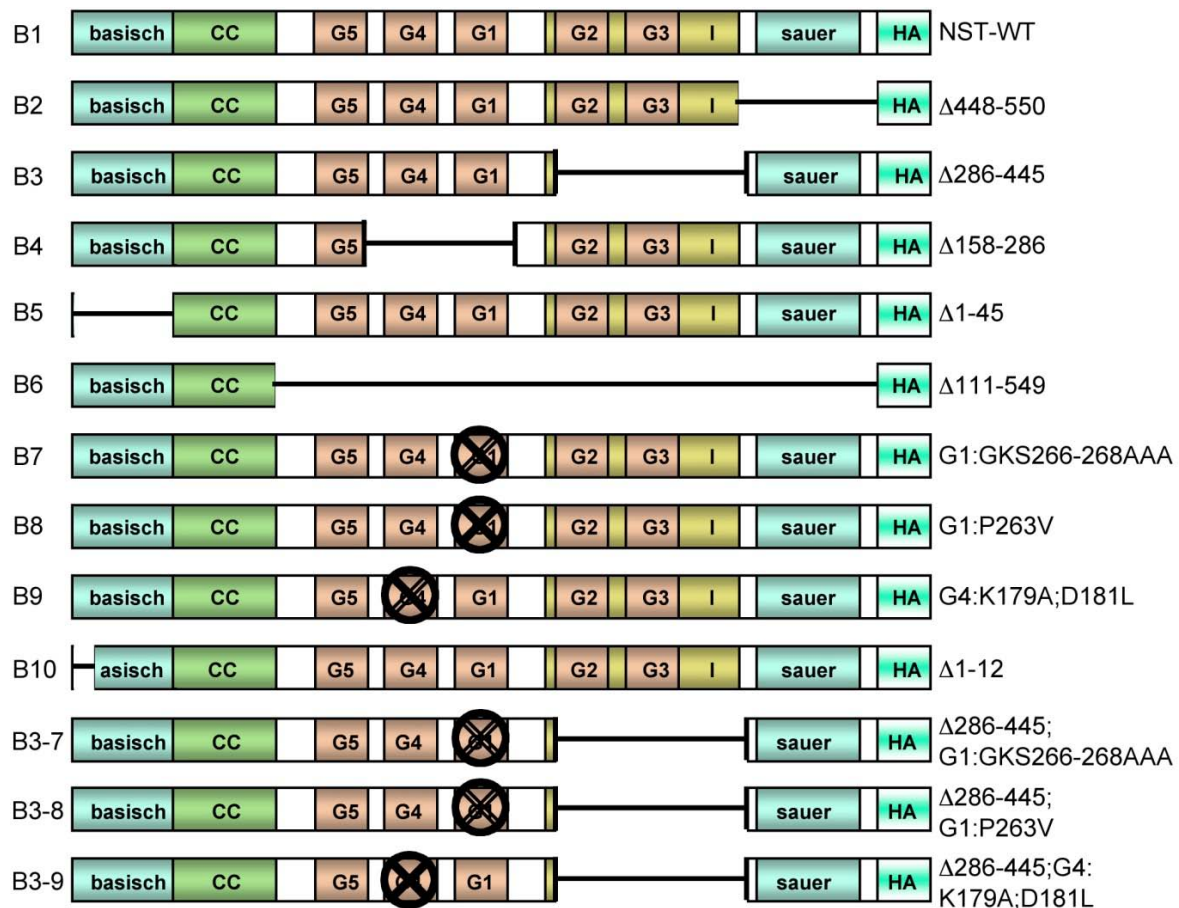


Abbildung 5 Mutanten des *nsf* Gens

Tsai und McKay identifizierten mittels PROSITE und *Conserved Domain search* (CDD) folgende Domänen und Motive: der N-Terminus des Proteins besteht aus 47 sehr basischen Aminosäuren und einer „Coiled-Coil“ (Doppelwendel) Domäne. Es folgen ein G4- und ein G1 GTP-Bindemotiv. Die *Intermediate* Domäne wird von Tsai und McKay nicht weitergehend beschrieben und definiert sich nur durch ihre Lage zwischen dem G1- GTP-Bindemotiv und einem Abschnitt aus 44 sauren Aminosäuren am C-Terminus des Proteins (saure Domäne; Tsai und McKay, 2002). Durch eigene Sequenzvergleiche konnten die G5-, G2- und G3- GTP-Bindemotive identifiziert werden.

Die Mutanten B2-B6 entstanden durch serielle Deletion der identifizierten Domänen, wie z.B. der sauren Domäne (B2) oder der basischen Domäne (B5). Die Mutante B7 trägt eine Punktmutation im G1 GTP-Bindemotiv, welches die Bindung eines GTP-Moleküls und die gleichzeitige Koordination eines Magnesium-Ions verhindern soll. Der Aminosäureaustausch der Mutante B8 imitiert eine onkogene Ras-Mutation, die sich durch konstitutive GTP-Bindung auszeichnet (Bos et al., 1989). Die Punktmutation der Mutante B9 im G4 Motiv (KXDL) verhindert die Koordination von Ribose- und Guanidin, wodurch eine GTP-Bindung gänzlich unterbunden wird. Die Mutante B10 stellt eine alternative

Spleißvariante der *nst* mRNA dar (Abbildung 6). Sie wurde generiert, nachdem eine Datenbankrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) die Existenz zweier unterschiedlich langer NST-Proteinisoformen vorhersagte.

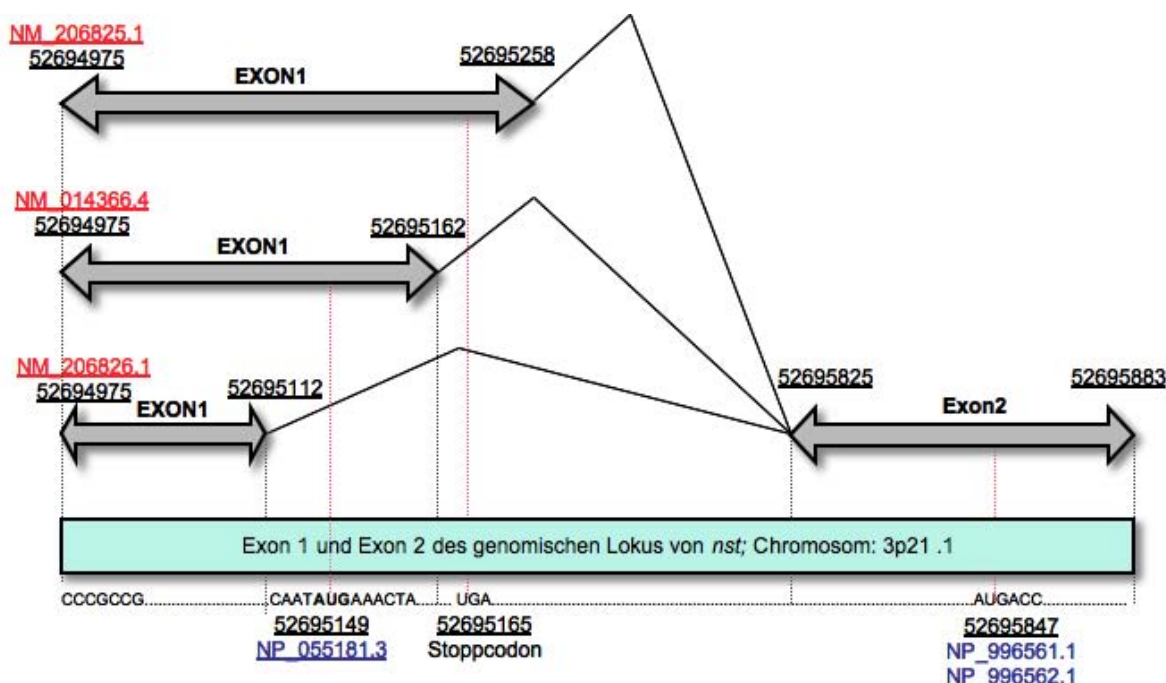


Abbildung 6 Spleiß- und Protein-Varianten des *nst* Gens.

Dargestellt ist der Anfang des genomischen Locus des *nst* Gens, welcher die ersten beiden Exons der mRNA kodiert. Unterstrichene schwarze Zahlen geben die genaue Position in Basenpaaren im genomischen Locus wieder. Die beiden rot dargestellten mRNA Varianten NM-206825.1 und NM-206826.1 kodieren die blau dargestellten Proteinvarianten NP-996561.1 und NP-996562.1. Nur in der mRNA Variante NM-014366.4 wird das erste Startkodon verwendet, da es weder durch differentielles Spleißen entfernt wird (wie in der mRNA Variante NM-206826.1), noch durch ein nachfolgendes Stoppkodon neutralisiert wird (siehe mRNA Variante NM-206825.1). Die Proteinvariante NP-055181.3 (blau dargestellt) stellt das Wildtyp-Protein in voller Länge dar.

Eine Isoform stellt das Wildtyp-Protein in voller Länge dar, während der anderen Isoform 12 Aminosäuren am N-Terminus fehlen. Die tatsächliche Expression der verkürzten Variante ist jedoch fraglich, da jegliche Proteinexpressions-Datenbanken nur die Präsenz der langen NST-Proteinvariante anzeigen. Die zwei Proteinisoformen werden von 3 unterschiedlichen mRNA Spleißvarianten kodiert. Alle 3 Varianten unterscheiden sich in der Länge des ersten Exons, wobei zwei mRNA Varianten ein Translationsinitiationskodon (AUG) in Exon2

besitzen. Die dritte mRNA Variante verwendet jedoch ein Startkodon im ersten Exon.

Die Mutanten B3-7, B3-8 und B3-9 spiegeln eine Kombination der Mutante B3 und der jeweiligen Punktmutanten B7 B8 und B9 wieder. Alle Mutanten wurden mit der Basensequenz des viralen Hämagglutinin (HA)-Epitops C-terminal fusioniert.

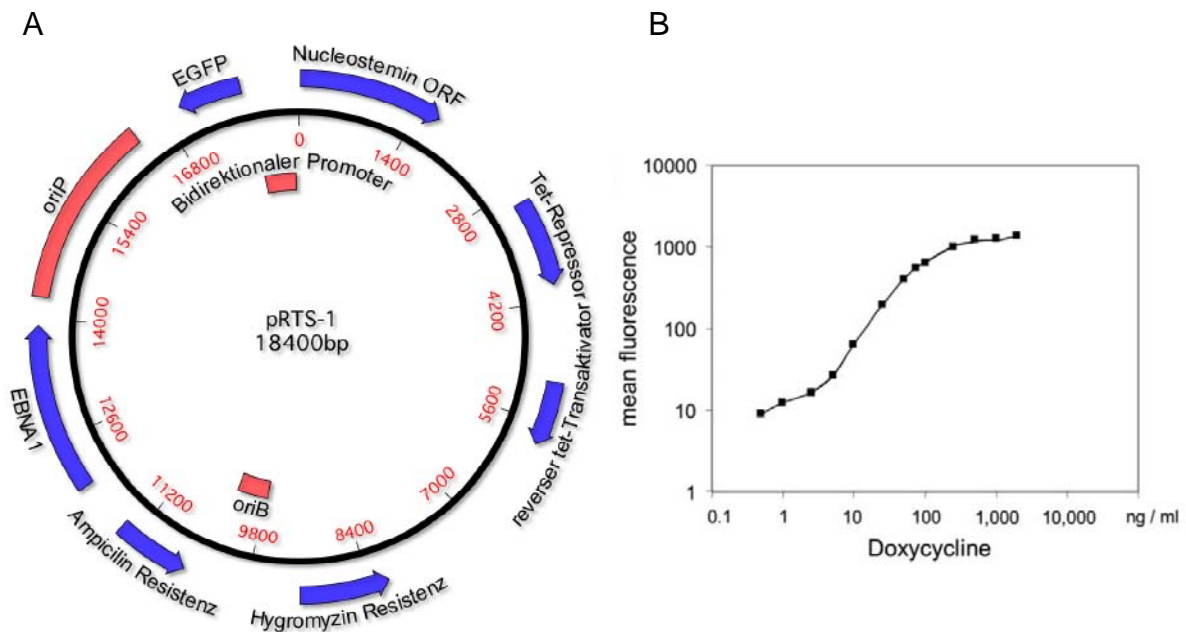


Abbildung 7 Der induzierbare pRTS-1 Expressionsvektor und sein Induktionsverhalten.

(A) Der Vektor besitzt einen bidirektionalen Promotor, der konstitutiv von einem Tetracyclin (Tet) responsiven Repressor reprimiert wird. Ein revers Tetracyclin kontrollierter Transaktivator kann nach Zugabe von Tetracyclin/Doxycyclin an 7 hintereinander liegenden Tet-responsiven Promotorelementen binden und induziert damit die gleichzeitige Expression von *eGFP* und *nst*. Selektion von transfizierten eukaryotischen Zellen wird durch ein Hygromycin Resistenzgen gewährleistet. (Eine weitere Vektorvariante verwendet ein Puromycin Resistenzgen als Selektionsmarker). Transformierte Bakterien können mit Hilfe eines Ampicillin Resistenzgens selektiert werden. Replikation in Bakterien wird durch einen bakteriellen *origin of replication* (*oriB*) vermittelt. Für eine stabile, extrachromosomale Replikation des Vektors in eukaryotischen Zellen wird ein plasmidaler *origin of replication* (*oriP*) und das *ebna-1* Gen des Epstein-Barr Virus benötigt. (B) Die Expressionsstärke des bidirektionalen Promotors ist von der verwendeten Doxycyclin-Konzentration abhängig. In dem Konzentrationsbereich 10-1000 ng/ml liegt eine direkte Proportionalität zwischen Induktor-Konzentration und *eGFP*-Menge (mean fluorescence) vor.

Grundlage für die Generierung der Mutanten bildete ein pUC18-Subklonierungsvektor, der das *nst* Wildtyp-Gen enthielt. Mit Hilfe von

Restriktions- und Ligationsklonierungen bzw. PCR basierten Mutagenese-Strategien wurden in diesem Vektor alle *nst* Mutanten generiert und anschließend in das konditionale Vektorsystem pRTS-1 transferiert. Die Korrektheit der Klonierung wurde zum einen durch Sequenzierung der DNA, zum anderen durch Überprüfung der Exprimierbarkeit der Mutanten in dem Vektorsystem überprüft. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide transient in die Lungenkarzinomzelllinie H2199 mittels eines lipidbasierten Transfektionsreagenzes transfiziert und diese Zellen 10 Tage in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums Hygromycin positiv selektiert. Zur Induktion der *nst* Mutanten-Expression erfolgte die Zugabe von Doxycyclin (0,5 µg/ml) zum Inkubationsmedium für 24h. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Nach Auftrennung der Lysate nach ihrer gelelektrophoretischen Mobilität und anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran konnte mit Hilfe eines HA-Epitop-spezifischen Antikörpers eine Immundetektion der Proteine der *nst* Mutanten vorgenommen werden. Anhand der HA-Signale ist ersichtlich dass alle Mutanten des *nst* Gens nach Induktion des pRTS-1 Vektors exprimiert werden (Abbildung 8).

3.1.3 Immundetektion der *nst* Mutanten mit Hilfe eines neu generierten NST Antikörpers

Mit Hilfe eines neu generierten NST-Antikörpers sollte die Expression der Mutanten in dem induzierbaren Vektorsystem überprüft werden und das vom Antikörper erkannte NST-Epitop spezifiziert werden (sog. Epitop-Kartierung, Kooperation mit Michaela Rohmoser (AG Eick) und Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum München; siehe auch Holzel et al., 2005). Dazu wurden von entsprechenden Zelllinien Proteinlysate hergestellt, diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem NST-Antikörper inkubiert (Abbildung 8).

Die B2- und die B6-Mutante werden vom NST-Antikörper nicht erkannt (Abbildung 8A). Beiden Mutanten fehlt der NST-C-Terminus, inklusive der sauren Domäne. Somit beinhaltet dieser Proteinabschnitt wahrscheinlich die antigene Determinante des NST-Antikörpers. Eine zweifelsfreie Identifizierung des Antikörper-Epitops erfordert allerdings ein ELISA-Experiment, mit synthetisch hergestellten, immobilisierten NST- Peptiden und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

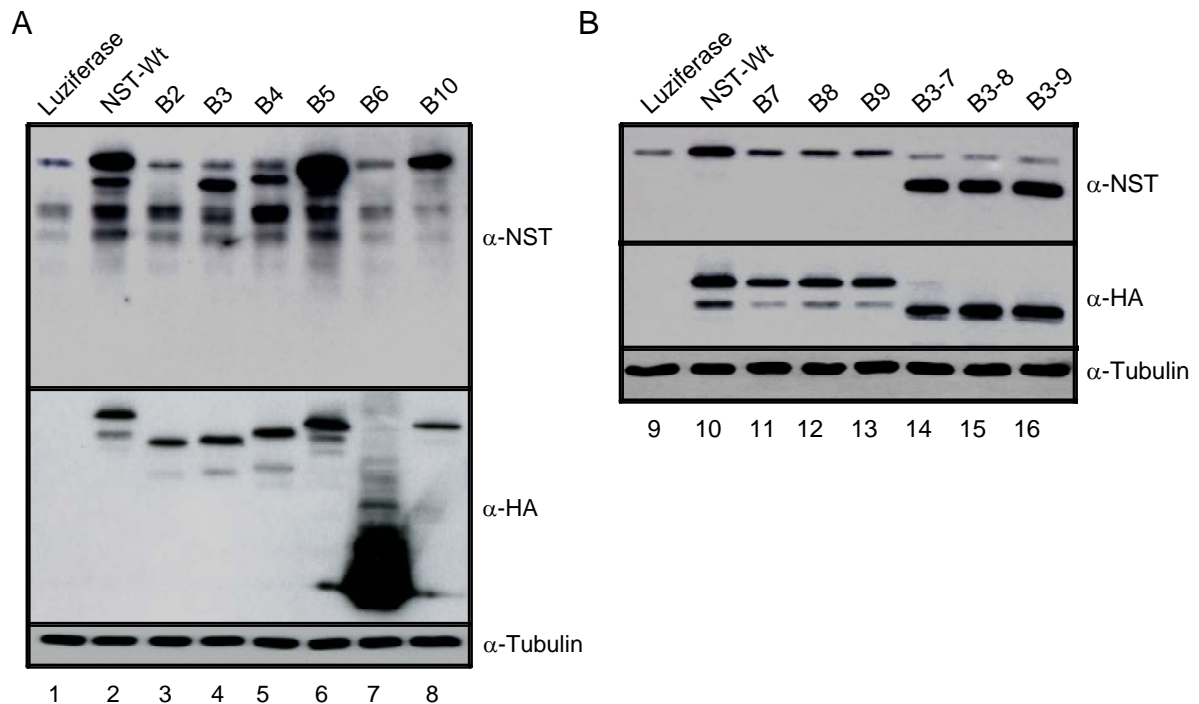


Abbildung 8 Der NST-C-Terminus wird vom NST-Antikörper als Epitop erkannt.

(A) Western-Blot Membran, inkubiert mit Antikörper gegen NST, HA-Epitop und Tubulin. Alle Mutanten von *nst* werden exprimiert, erkennbar anhand der HA-Banden. Der NST-Antikörper erkennt jedoch die Mutante B2 und B6 nicht (Spur 3 und 7). (B) Die Proteine der Mutanten B4, B7, B8 und B9 werden im Vergleich zum Wildtyp-Protein und zu den Proteinen der Mutanten B3, B5, B10, B3-7, B3-8 und B3-9 in etwa gleich gut erkannt, sind aber wahrscheinlich schwächer exprimiert. Tubulin-Banden zeigen eine vergleichbare Proteinbeladung zwischen den Spuren an.

3.1.4 Lokalisationsphänotypen der *nst* Mutanten

Welchen Lokalisationsphänotyp zeigen die *nst* Mutanten? Um diese Frage zu beantworten, wurde ihre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Transient mit pRTS-1-*nst* Vektoren transfizierte Zellen wurden dazu mit Doxycyclin (0,5 µg/ml) für 14 Stunden induziert und anschließend mit Paraformaldehyd auf Glasplättchen fixiert. Die Dauer der Fixierung ist ein kritischer Parameter und wurde deshalb für den HA- als auch für den NST-Antikörper optimiert. Nach Immundetektion der exprimierten Mutanten mit einem Primär- und Sekundärantikörper wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und zufällig ausgewählte Areale fotografiert. Um die Spezifität der indirekten Antikörperdetektion zu prüfen, wurden fixierte Zellen entweder nur mit dem Primärantikörper oder nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

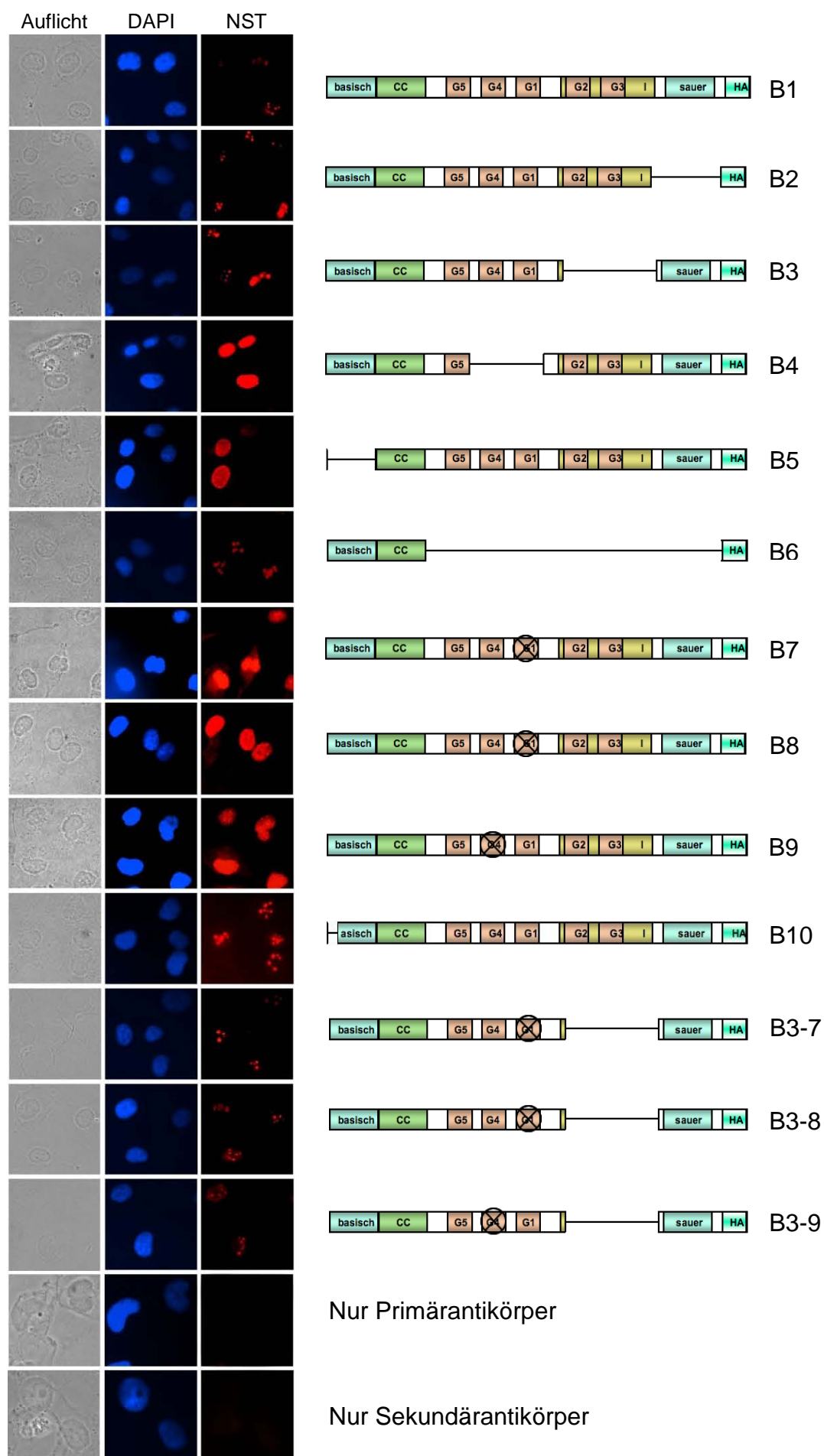


Abbildung 9 Lokalisationsphänotypen der *nst*-Mutanten

Dargestellt sind Auflicht-Aufnahmen, DAPI-Färbungen der Zellkerne und Antikörper-basierte Färbungen von NST. Daneben ist die Domänenstruktur der jeweils exprimierten Mutante abgebildet. Die Färbungen gegen NST sind sehr spezifisch, da der Primär- als auch der Sekundärantikörper alleine keine Hintergrundsignale durch Eigenfluoreszenz oder unspezifische Bindung verursachen.

Anhand der Aufnahmen ist zu erkennen, dass Wildtyp-NST (B1) vorwiegend im Nukleolus lokalisiert. Dies trifft ebenfalls auf die Mutanten B2, B3, B6, B10, B3-7, B3-8 und B3-9 zu. Dagegen zeigen die Mutanten B4, B5, B7, B8 und B9 eine starke nukleoplasmatische Färbung. Die isolierte Verwendung des Primär-als auch des Sekundärantikörpers resultiert in keinerlei Fluoreszenzsignale und bestätigt somit, dass beide Antikörper ihr jeweiliges Epitop spezifisch erkennen.

3.1.5 Integrität des Nukleolus nach Überexpression der *nst* Mutanten

Nucleophosmin (NPM) ist ein nukleoläres Protein und ein sehr sensibler und gut quantifizierbarer Marker für nukleoläre Integrität. Nach Behandlung von Zellen mit Chemotherapeutika werden wesentliche Schritte der Ribosomenbiogenese dadurch gehemmt und NPM in das Nukleoplasma transloziert (Chan et al., 1996). NPM besitzt, ähnlich wie NST, eine Nukleotid-Hydrolase-Aktivität und pendelt ständig zwischen dem Nukleolus und dem Nukleoplasma hin und her (Finch et al., 1993; Chen und Huang, 2001; Tsai und McKay, 2005). Hinzu kommt, dass NPM und NST nicht nur in Interphase-Zellen interagieren, sondern auch in prä-nukleolären Körperchen nach der Mitose einen Komplex bilden (Ma et al., 2008). Beide Proteine kolokalisieren außerdem in der granulären Komponente des Nukleolus. Somit lag der Schluss nahe, die Lokalisation von NPM nach Überexpression der *nst* Mutanten zu prüfen, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Verursacht die Überexpression von *nst* oder der *nst* Mutanten eine Inhibition von nukleolären Funktionen, die mit einer Translokation von NPM in das Nukleoplasma einhergeht?
2. Kann NST aufgrund seiner Interaktion mit NPM letzteres fehllokalisieren? Hier sind vor allem die *nst* Mutanten von Interesse, die im Nukleoplasma lokalisieren.

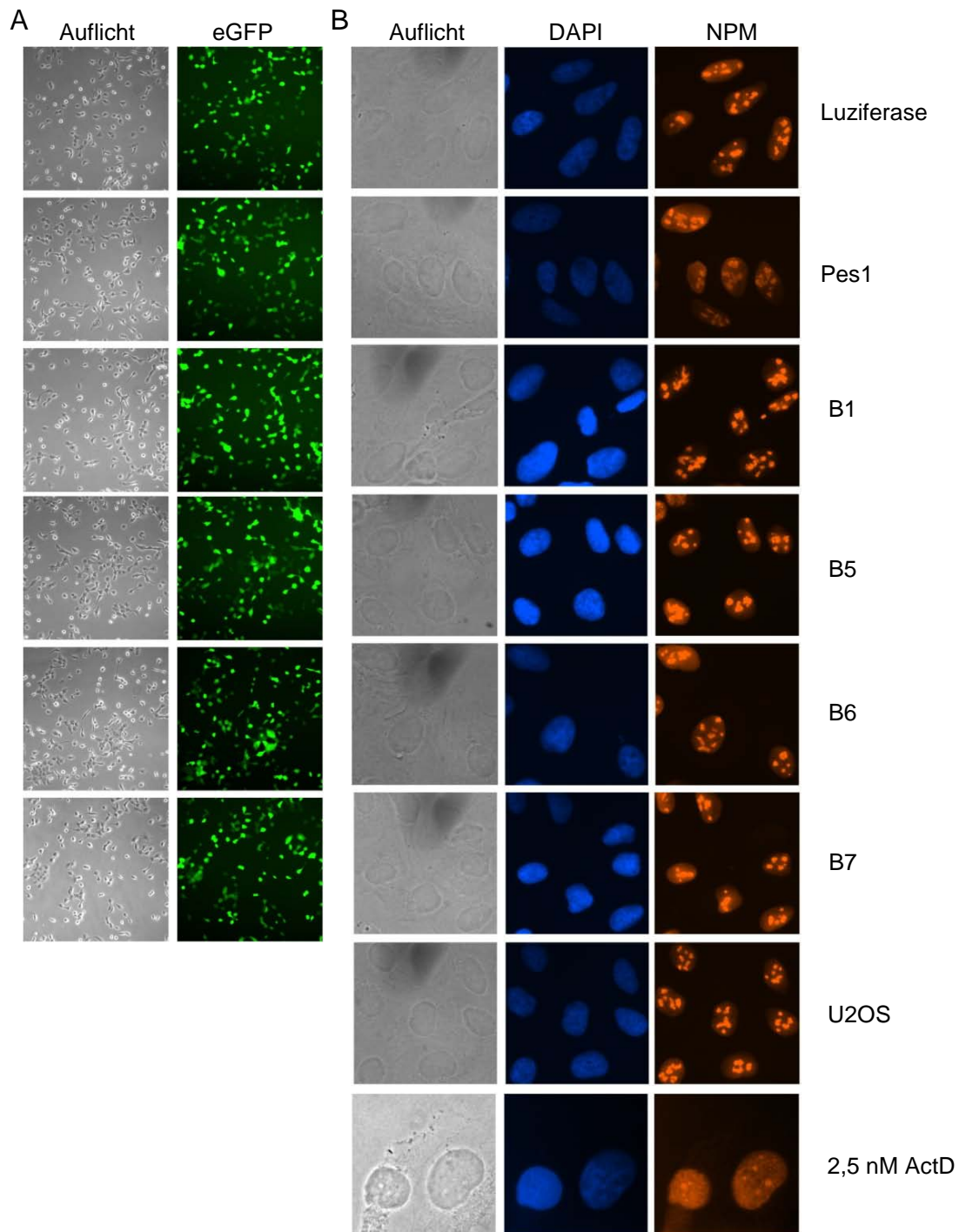


Abbildung 10 Die Überexpression der *nst* Mutanten verursacht keine Lokalisationsänderung von endogenem, nukleolärem NPM.

Gezeigt ist eine repräsentative Auswahl an *nst* Mutanten überexprimierenden Zellen. (A) Die Expression der Mutanten wird durch einen eGFP-Reporter in ca. 95% aller Zellen angezeigt. (B) Die nukleoläre Lokalisation von NPM ändert sich in Anwesenheit der exprimierten *nst*-Mutanten nicht. Um die Translozierbarkeit von NPM zu kontrollieren, wurden U2OS-Zellen mit 2,5 nM Actinomycin D für 6h inkubiert. Diese Zellen zeigen eine vorwiegend nukleoplasmatische Lokalisation von NPM. Die Expression von Luziferase oder von Pes1 zeigt keine Effekte auf NPM-Lokalisation und diente als Negativkontrolle.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Expression von *nst* und seiner Mutanten in konditionalen Zelllinien für 36h induziert und die Lokalisation von endogenem NPM mittels indirekter Immunfluoreszenz abgefragt. Die simultane Detektion von NPM bzw. der Proteine der NST-Mutanten war aufgrund der gleichen Spezies der entsprechenden Antikörper nicht möglich. Die Expression der NST-Proteine konnte jedoch anhand der gleichzeitigen eGFP-Fluoreszenz auf Einzelzellniveau überprüft werden.

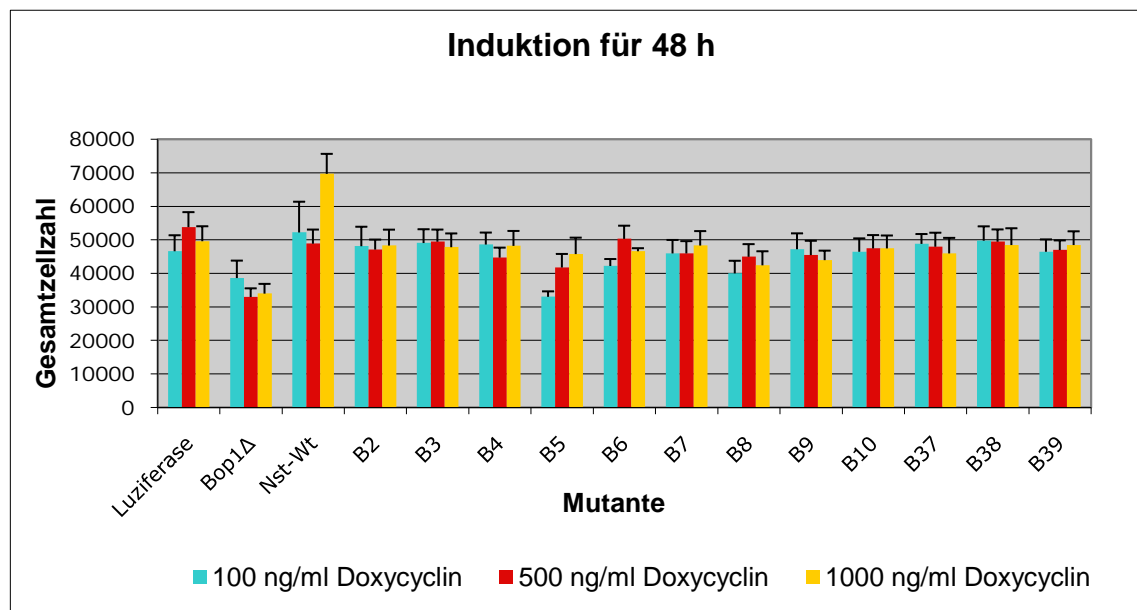
Es bleibt festzuhalten, dass die Expression keiner *nst* Mutante die nukleoläre Lokalisation von NPM beeinflusste. Somit wird auch die Nukleolusfunktion durch Überexpression der *nst* Mutanten nicht beeinträchtigt.

3.1.6 Effekte überexprimierter *nst* Mutanten auf die Zellproliferation

Das NST-Hefehomolog NUG1 befindet sich in einem Komplex mit den Hefehomologen von BOP1, WDR12 und Pes1 (sog. PeBoW-Komplex). Von letzteren konnten dominant-negative Mutanten identifiziert werden, die Ribosomenbiogenese und Zellproliferation hemmen. Somit ergab sich die Frage, ob die Expression der *nst* Mutanten Zellproliferation ebenfalls hemmen kann?

Um dies zu überprüfen, wurden *nst* Mutanten in stabilen U2OS-Zellen konditional exprimiert. Es wurden je 35 000 Zellen pro Petrischale gleichmäßig ausplattiert und mit Doxycyclin in 3 unterschiedlichen Konzentrationen (0,1/ 0,5/ 1,0 µg/ml) induziert. Die Gesamtzellzahlen der Zellkulturen wurden nach 48h und 120h bestimmt. Somit konnte eine lineare Abhängigkeit der Zellproliferation von der Expressionsstärke der *nst* Mutanten und der Inkubationsdauer überprüft werden. Um eine statistische Signifikanz zu gewährleisten, wurden pro Zelllinie und pro Doxycyclin-Konzentration jeweils 3 biologische Replikate ausplattiert, welche jeweils zweimal mit Hilfe eines Partikelzählgerätes ausgezählt wurden. Somit konnten valide Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung berechnet werden. Als Positivkontrolle für Proliferationsdefekte diente überexprimiertes *bop1Δ*, eine Mutante von *bop1*, welcher 231 Aminosäuren des N-Terminus fehlen (Strezoska et al., 2000). Bekannt ist, dass die Überexpression dieser Mutante einen reversiblen p53-vermittelten G1-Zellzyklusarrest in NIH-3T3 Zellen induziert.

A



B

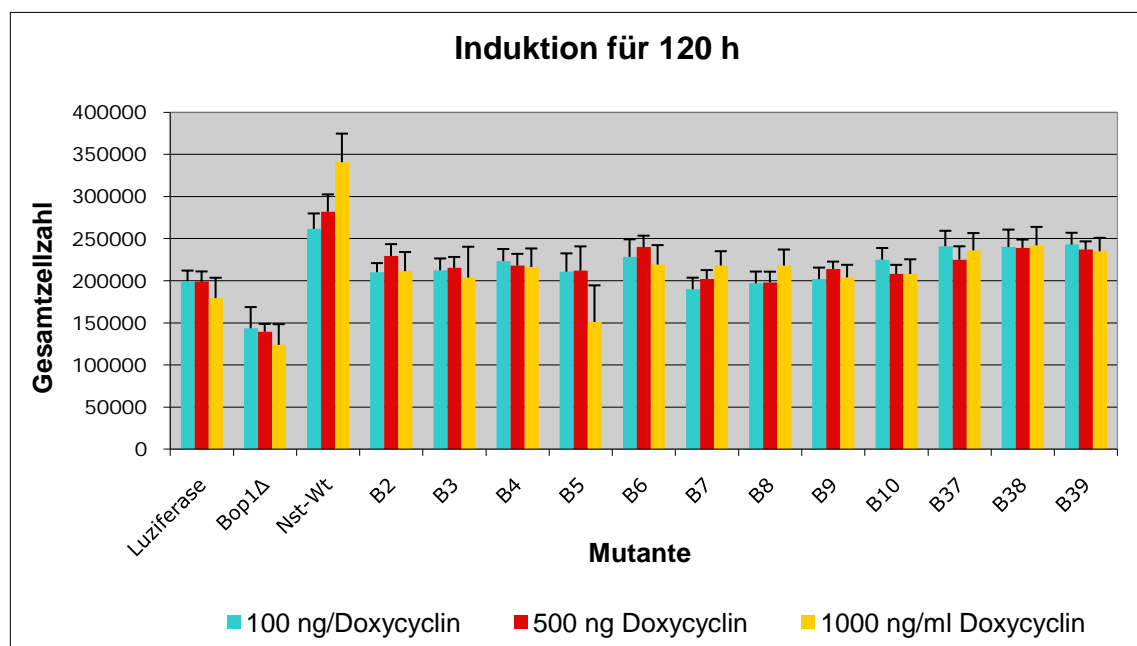


Abbildung 11 Überexprimiertes NST Wildtyp-Protein erhöht die Proliferation von U2OS-Zellen signifikant.

(A) Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen nach 48h Induktion von konditionalen U2OS –Zellen, welche die *nst* Mutanten exprimieren. Die Zellen wurden mit 0,1-, 0,5- und 1,0 µg/ml Doxycyclin induziert. (B) Gesamtzellzahlen der Zelllinien nach 120h Induktion. Die Standardabweichungen errechneten sich aus Triplikat-Messwerten, die mittels eines Partikelzählgerätes ermittelt wurden.

Als Negativkontrolle wurde eine Luziferase exprimierende Zelllinie gewählt, welche nach Induktion keine Proliferationsdefekte zeigt. Die Mutante *bop1Δ*

induziert den bereits bekannten Proliferationsdefekt (Abbildung 11). Dieser Defekt ist aber kaum von der Doxycyclin-Konzentration abhängig. Hingegen ist auffällig, dass die Wildtyp-exprimierende Zelllinie mit zunehmender Doxycyclin-Konzentration ihre Proliferationsgeschwindigkeit signifikant erhöht. Alle anderen *nst* Mutanten zeigen keinen auffälligen Proliferationsphänotyp nach 120h Expression.

3.2 Der *knock-down* Phänotyp von *nst*

Die Überexpression der *nst* Mutanten und die Analyse ihrer entsprechenden Phänotypen stellt eine Methode dar, um die Funktion des NST-Proteins zu charakterisieren. Ein anderes Charakterisierungsverfahren repräsentiert die so genannte RNA Interferenz Technik (RNAi). Sie basiert auf einer temporären Herabregulation (*knock-down*) der Genexpression mittels kurzer, doppelsträngiger Oligonukleotide (Fire et al., 1998). Diese Technik bietet unter anderem den Vorteil, dass Phänotypen erfasst werden können, die in entsprechenden *knock-out*-Mäusen aufgrund von letaler Wirkung nicht untersucht werden können. Auch für *nst* wurden entsprechende Mäuse mit inaktivierten *nst* Allelen hergestellt. Diese *nst* (-/-)-Mäuse sterben aber am Tag 4 der Embryogenese (Beekman et al., 2006). Somit bot sich die RNA Interferenz Technik auch für die Funktionscharakterisierung von NST *in vitro* an.

Die Durchführung eines siRNA vermittelten *knock-downs* in humanen Zellen stellt keine großen Anforderungen an den Operator. Es ist jedoch entscheidend, dass die doppelsträngigen Oligonukleotide in möglichst alle vorhandenen Zellen gleichmäßig transfiziert werden. Nur so wird eine effiziente Herabregulation des Gens gewährleistet und es müssen keine Phänotypen aufgrund eines Partial-*knock-downs* analysiert werden. Des Weiteren ist es zwingend erforderlich, dass der *knock-down* des Gens spezifisch ist. Darauf muss bei einer entsprechenden siRNA-Zielsequenz-Identifizierung Wert gelegt werden und war im Falle von *nst* mit einigen Schwierigkeiten behaftet (siehe Material und Methoden).

3.2.1 Identifizierung von siRNA-Zielsequenzen mit Hilfe von Suchalgorithmen

RNAi-Experimente erfordern einen spezifischen *knock-down* eines Gens, dessen Phänotyp mit mehr als einer siRNA reproduziert werden kann. Somit sollten für

nst zwei voneinander unabhängige siRNAs identifiziert werden, die zur Kontrolle der Phänotypen, aber auch für spätere *knock-down knock-in* Experimente verwendet werden konnten. Diese Experimente erfordern eine siRNA-Zielsequenz, die sich nicht im offenen Leseraster (ORF), sondern im untranslatierten Bereich (UTR) des *nst* Gens befindet. Die Identifizierung der benötigten Zielsequenzen erfolgte mit Hilfe der Algorithmen der Firmen Dharmacon, Inc und Rosetta Inpharmatics.

Matrizenstrang-Sequenz	Position in mRNA (bp)	Region	GC (%)	<i>knock-down</i> Wahrscheinlichkeit (%)
5`- AAGAACTAAAACAGCAGCA-3`	389	ORF	49	78
5`-GGTATGCATGAGCTGTGTA-3`	1900	3`UTR	47	69

Tabelle 5 siRNA-Zielsequenzen im ORF- und 3`UTR der *nst* mRNA, identifiziert vom Dharmacon Suchalgorithmus.

Dargestellt ist die Zielsequenz, die genaue Lage der Zielsequenz in der mRNA (ORF, *open reading frame*; UTR, untranslatierter Bereich), ihr GC-Gehalt und die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen *knock-down*. Die erste siRNA-Zielsequenz wurde bereits von Tsai und McKay identifiziert (Tsai und McKay, 2002). Die zweite siRNA Zielsequenz kann aufgrund ihrer Lage im 3`UTR Bereich für *knock-down knock-in* Experimente verwendet werden.

Mit Hilfe des Dharmacon siRNA *Design* Algorithmus wurde die, bereits aus einer Publikation bekannte, *nst*-siRNA-Zielsequenz identifiziert, welche im offenen Leseraster kodiert (Tsai und McKay, 2002). Aus der Publikation ist ersichtlich, dass diese siRNA die Eigenschaft besitzt, das NST-Protein sehr effizient und spezifisch herabzuregulieren und sie wurde deshalb für eigene *nst knock-down* Experimente ebenfalls verwendet. Des Weiteren konnte eine zweite Zielsequenz identifiziert werden, die sich im 3`untranslatierten Bereich der *nst* mRNA befindet und somit zur Verwendung in einem *knock-down knock-in* Experiment geeignet war (siehe Material und Methoden).

Während der Etablierung späterer Experimente zeigte sich, dass sich die beiden siRNAs im Hinblick auf ihre *knock-down* Effizienz unterscheiden. Die 3`UTR-siRNA induziert eine geringere Herabregulation des NST-Proteins als die von Tsai und McKay identifizierte siRNA. Um dieses Defizit zu kompensieren, wurde nach weiteren, potenteren siRNA Zielsequenzen im untranslatierten Bereich der *nst* mRNA mit Hilfe des Rosetta Inpharmatics Algorithmus gesucht (Tabelle 6 und Material und Methoden).

Matrizenstrang Sequenz	Position in mRNA (bp)	Region	GC (%)	<i>knock-down</i> Wahrschein- lichkeit (%)
5'-CTCGTCAGTGGCTTCAGTT-3'	99	5'UTR	33	89
5'-GTTGATGTGTTTGTGCTTC-3'	142	5'UTR	39	81
5'-CAATTCATCTCATTGTGAG-3'	1982	3'UTR	43	80
5'-CTCATTGTGAGTGGAAGTA-3'	1990	3'UTR	44	83
5'-CATTGTGAGTGGAAGTAGC-3'	1992	3'UTR	41	81

Tabelle 6 siRNA-Zielsequenzen im untranslatierten Bereich der *nst* mRNA, identifiziert vom Rosetta-Suchalgorithmus

Dargestellt ist die Zielsequenz, die genaue Lage der Zielsequenz in der mRNA (UTR, untranslatierter Bereich), ihr GC-Gehalt und die Wahrscheinlichkeit für einen erfolgreichen *knock-down*. Diese Sequenzen wurden bisher von keinem frei zugänglichen siRNA-Suchalgorithmus identifiziert und zeichnen sich durch eine hohe *knock-down* Wahrscheinlichkeit von über 80% aus. Diese siRNAs werden im Folgenden nach ihrem Suchalgorithmus und ihrer Lage in der *nst* mRNA benannt. Das erste Oligonukleotid wird demnach mit dem Namen Rosetta 5'UTR1 eindeutig beschrieben.

3.2.2 *Knock-down*-Effizienzen der identifizierten siRNAs

In der *nst* mRNA-Sequenz konnten mit Hilfe zweier Suchalgorithmen insgesamt 7 verschiedene siRNA Zielsequenzen identifiziert werden. Welche der entsprechenden siRNAs verursacht nun eine signifikante Herabregulierung des NST-Proteins?

Die Proteinhalbwertszeit bestimmt entscheidend die Effizienz, mit der eine siRNA ein bestimmtes Protein herabregulieren kann. Eine lange Halbwertszeit indiziert die Verwendung von Langzeit-Transfektionsbedingungen (z.B. Erhöhung der Transfektionshäufigkeit), da sich nur so eine signifikante Reduktion der bereits vor der siRNA-Transfektion existierenden Proteinpoptulation erreichen lässt. Um die Halbwertszeit von NST zu bestimmen, wurde ein Translationsinhibitions-Experiment mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid durchgeführt (Abbildung 12).

Das Ergebnis des Experiments zeigt, dass das NST-Protein über einen Zeitraum von 14h stabil ist. Für eine signifikante Mengenreduktion der NST-Proteinpoptulation wurden deshalb zwei siRNA Transfektionen mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamine an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Am Tag nach der letzten Transfektion wurden die Zellen nur mit Zellmedium inkubiert, um ihnen eine Erholung vom Transfektionsstress und eine

Etablierung des *knock-down* Phänotypes zu ermöglichen. Am Tag 4 erfolgte dann die Lyse in Laemmli-Lysepuffer und die entsprechende Immundetektion auf einer Western Blot-Membran.

Die Wahl einer geeigneten Zelllinie für das Transfektionsexperiment ist ein kritischer Parameter. Zur Charakterisierung der *nst* siRNAs wurde die Osteosarkoma Zelllinie U2OS (ATCC NR. HTB-96) gewählt. Sie besitzt zwei intakte p53 Allele und ist somit auch potenziell dazu geeignet, eine durch eine NST-Interaktion vermittelte p53-Stabilisierung anzuzeigen (Tsai und McKay, 2002). Des Weiteren proliferiert diese Zelllinie im Vergleich zu anderen humanen Krebszelllinien sehr langsam. Somit wird auch die transfizierte siRNA-Population nicht zu schnell durch Zellteilung ausgedünnt und kann somit einen stärkeren *knock-down* Phänotyp induzieren.

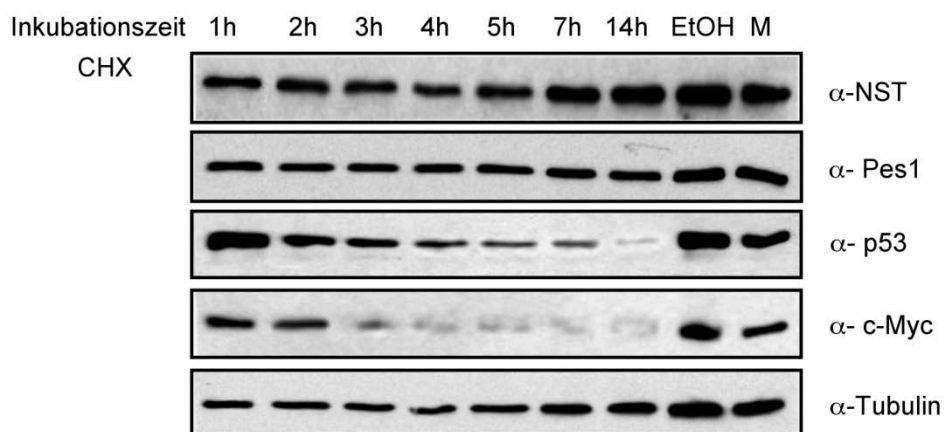


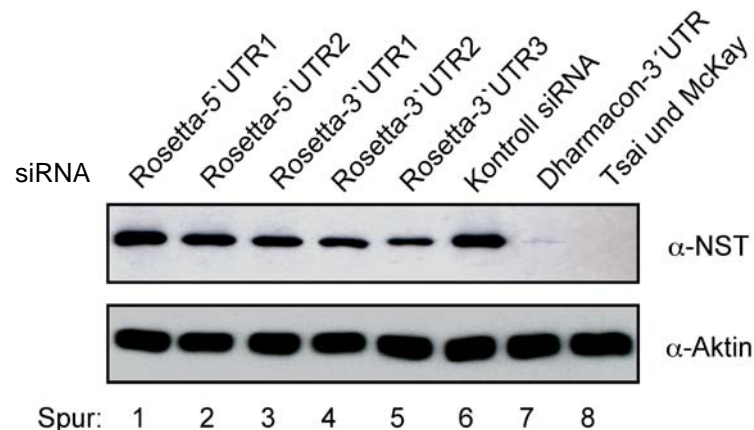
Abbildung 12 Das NST-Protein ist über einen Zeitraum von 14h stabil

Subkonfluente U2OS-Zellen wurden mit Cycloheximid-haltigem Zellkulturmedium kultiviert und nach der angegebenen Inkubationszeit lysiert. Der Western-Blot zeigt NST und Pes1, die über einen Zeitraum von 14h nahezu stabil sind. Als Kontrollproteine wurden p53 und c-Myc gewählt, da beide Proteine eine geringe Halbwertszeit besitzen. Tubulin zeigt die Proteinmengen in den jeweiligen Spuren an. Cycloheximid ist in 100% Ethanol (EtOH) gelöst. Dieses Lösungsmittel hat nach 14h Inkubation keinen Effekt auf die Proteinmengen, vergleichbar mit einer Inkubation mit Zellkulturmedium (M).

Die Tsai und McKay- sowie die Dharmacon-siRNAs induzieren einen deutlichen *knock-down* von *nst* (Abbildung 13). Dies zeigt sich sowohl in entsprechenden Western-Blots mit Proteintotallysaten, als auch auf Einzelzellniveau in Immunfluoreszenzen der transfizierten Zellen. Bei Betrachtung mehrerer repräsentativer Immunfluoreszenzen von Zellen, welche mit beiden siRNAs

transfiziert worden sind, zeigte sich, dass die *knock-down* Effizienz der Tsai und McKay siRNA größer, als die der Dharmacon siRNA ist. Mit dem Rosetta-Algorithmus identifizierte siRNAs zeigen keine Effekte auf die NST-Proteinmenge. Auch die Kontroll-siRNA gegen Luziferase zeigt im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz keinen Effekt auf NST wie ein Vergleich von nicht-transfizierten und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigt.

A



B

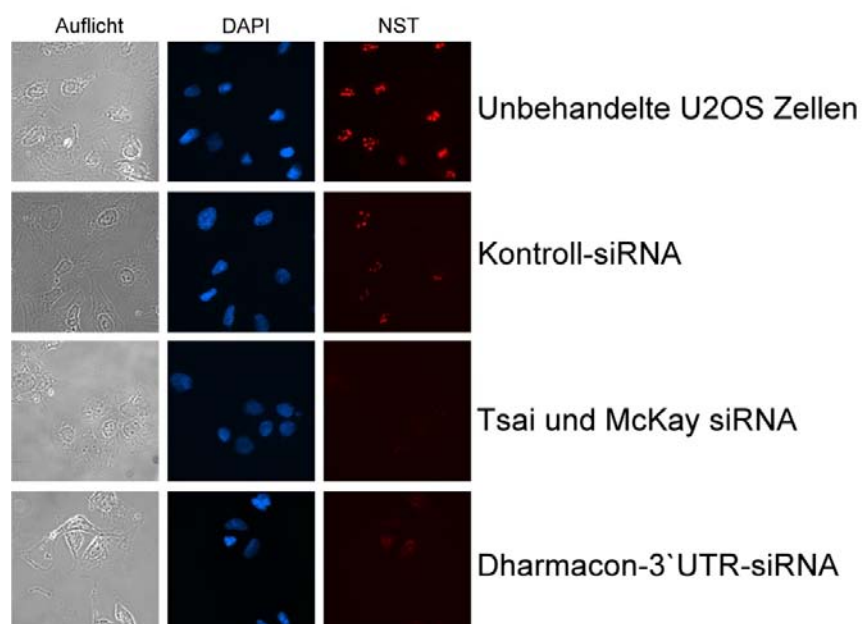


Abbildung 13 Zwei siRNAs können die Menge an NST-Protein signifikant reduzieren

(A) U2OS-Zellen wurden mit den entsprechenden siRNAs zweimal transfiziert und 24h nach der letzten Transfektion lysiert. Aktin dient als Kontrollprotein für gleichen Proteingehalt in allen Spuren (B) Repräsentative Immunfluoreszenzen von fixierten U2OS-Zellen, die mit den entsprechenden siRNAs zweimal transfiziert worden sind. NST wurde indirekt mit Hilfe eines Cyan3-gekoppelten Sekundärantikörpers angefärbt.

3.2.3 Der *knock-down* von *nst* hemmt die Zellproliferation

Das Hefe-Homolog von NST, NUG1, interagiert mit einem Proteinkomplex bestehend aus ERB1, YTM1 und YPH1. Die entsprechenden Proteine dieses Komplexes in Säugern sind BOP1, WDR12 und Pes1. Der *knock-down* der entsprechenden Gene hemmt Zellproliferation (Holzel et al., 2005; Grimm et al., 2006, Strezoska et al., 2002). Wie beeinflusst der *nst knock-down* die Proliferation von Zellen? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Proliferationsexperiment über mehrere Tage mit HCT116-Zellen (ATCC Nr. CCL-247) durchgeführt (Abbildung 14).

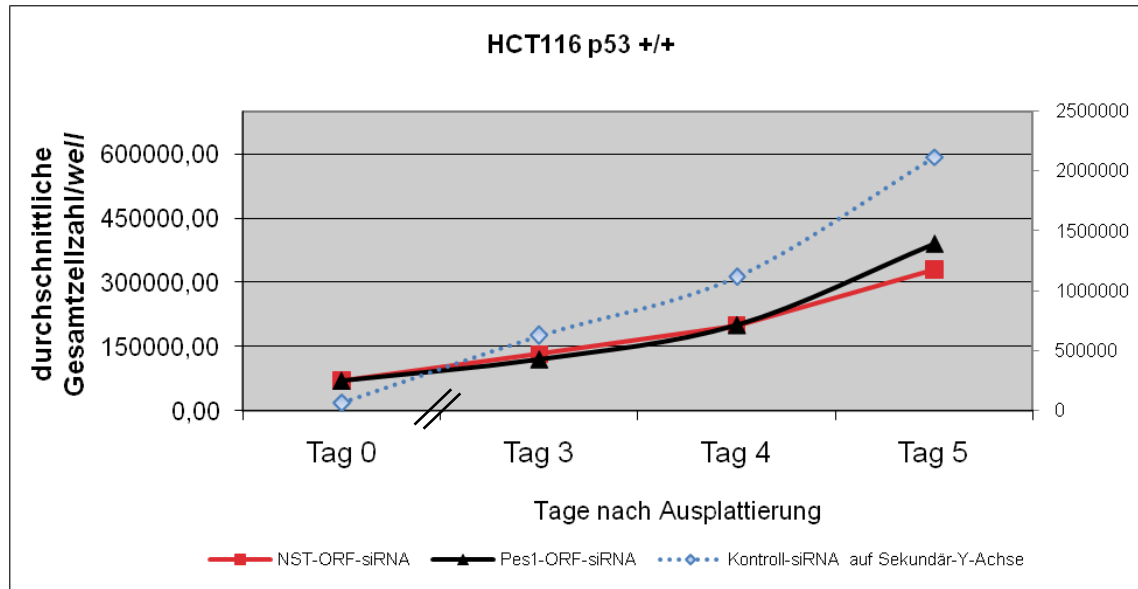
Diese Kolorektalkarzinom-Zelllinie existiert in zwei Varianten. Erstere besitzt zwei funktionelle p53 Allele (HCT116 p53 +/+), letztere ist p53-defizient (HCT116 p53 -/-). Somit ist es möglich, p53-abhängige Phänotypen in einem ansonst isogenen Zellsystem zu erfassen und zu kontrollieren. Diese HCT 116 p53 +/+ und p53 -/- Zellen wurden in geringer Dichte im 6-well-Format als Triplikate ausplattiert und zweimal mit *nst* siRNA transfiziert. Zu Kontrollzwecken wurden beide Zelllinien mit einer siRNA gegen Luziferase und gegen *pes1* transfiziert. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe eines Partikelzählgerätes im 24h Intervall gemessen. Bedingt durch die Adhärenz der lebenden Zellen (tote Zellen liegen in Suspension vor) war eine Viabilitätsunterscheidung z.B. mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung nicht nötig. Die Zellzahl eines jeden Triplikats wurde zweimal bestimmt und gemittelt. Die Standardabweichung der Messwerte war aufgrund der Verwendung des standardisierten Messverfahrens des Partikelzählgerätes kleiner als 3%.

Der *nst knock-down* erzeugt in HCT116 p53 +/+ Zellen einen etwas stärkeren Proliferationsdefekt als in HCT116 p53 -/- Zellen (Abbildung 14). Noch deutlicher treten die Unterschiede im Proliferationsverhalten beider Zelllinien nach Transfektion der Pes1-siRNA zu Tage. Während Pes1 depletierte HCT116 p53 -/- Zellen fast ein identisches Proliferationsverhalten wie nach Transfektion der *nst*-siRNA zeigen, teilen sich HCT116 p53 +/+ 2 Tage nach *pes1-knock-down* kaum mehr.

Die leichte Abhängigkeit des Proliferationsverhaltens vom p53-Status der Zellen lässt die Frage aufkommen, ob ein *knock-down* von *nst* das Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert. Um dies festzustellen, wurden U2OS-

Zellen mit *nst* und *pes1*-spezifischen siRNAs zweimal transfiziert und auf p53-Stabilisierung hin überprüft (Abbildung 15). Sowohl der *knock-down* von *pes1* als auch von *nst* führen beide zu erhöhten Mengen von p53 in U2OS-Zellen.

A



B

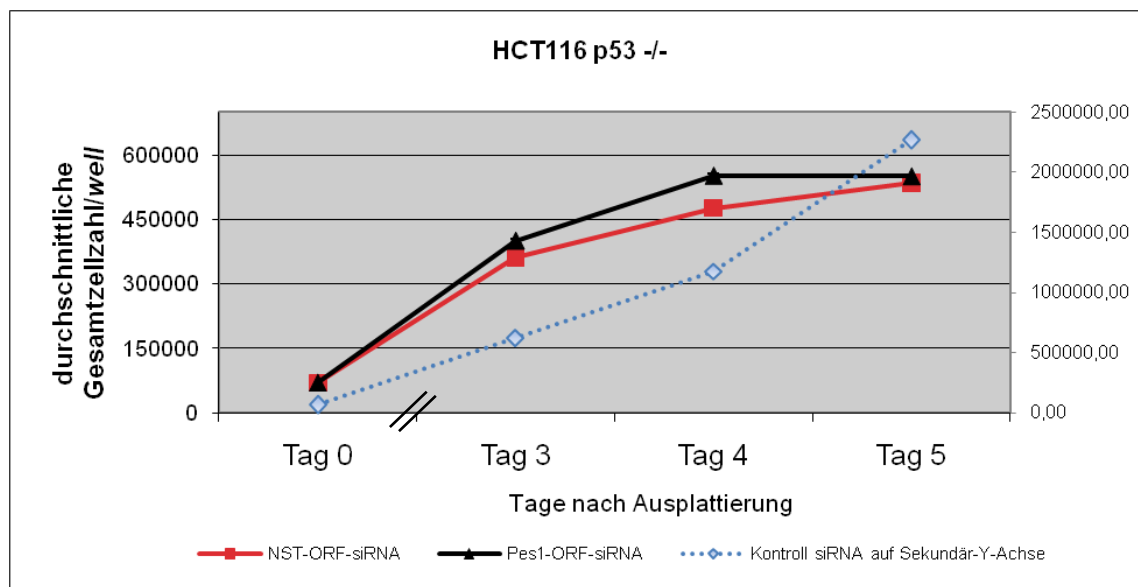
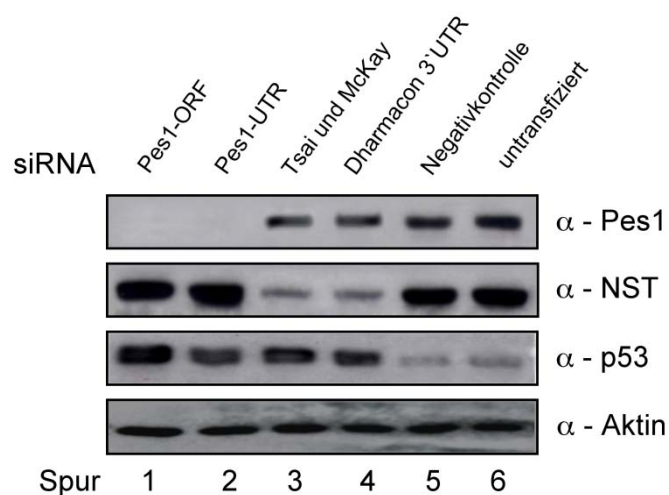


Abbildung 14 Der *knock-down* von *nst* hemmt die Proliferation in HCT116 p53 +/+ und p53 -/- Zellen.

Es wurden initial 70000 Zellen pro 6-well ausplattiert und diese zweimal an aufeinanderfolgenden Tagen mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. 24h nach der letzten Transfektion (Tag 3) wurde die Zellzahl jeweils zweimal mit Hilfe eines Partikelzählgerätes ermittelt. (A) Proliferationsverlauf von HCT116 p53 +/+ Zellen über 5 Tage. (B) Proliferationsverlauf von HCT116 p53 -/- Zellen. Der Proliferationsverlauf der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen ist auf der rechten Sekundär-Y-Achse abgebildet.

Das p53-Protein ist in untransfizierten Zellen kaum stabilisiert (Spur 6). Auch eine Transfektion der Kontroll-siRNA induziert keine p53-Stabilisierung (Spur 5). Jedoch bewirken der *knock-down* von *pes1* und *nst* eine signifikante Erhöhung der p53-Menge, wie aus Spur 1-4 hervorgeht. Bestätigt wird dies durch Beobachtungen auf Einzelzellniveau in den Immunfluoreszenzen. Man erkennt deutlich eine starke Zunahme des nukleären p53-Signals nach Transfektion von *pes1*- oder *nst*-spezifischer siRNA (Abbildung 15B).

A



B

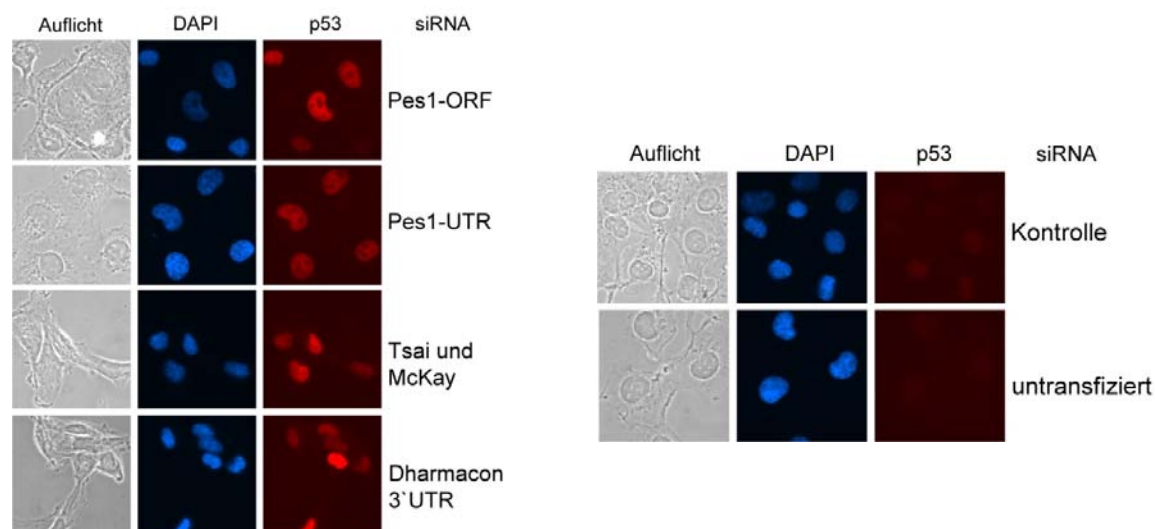
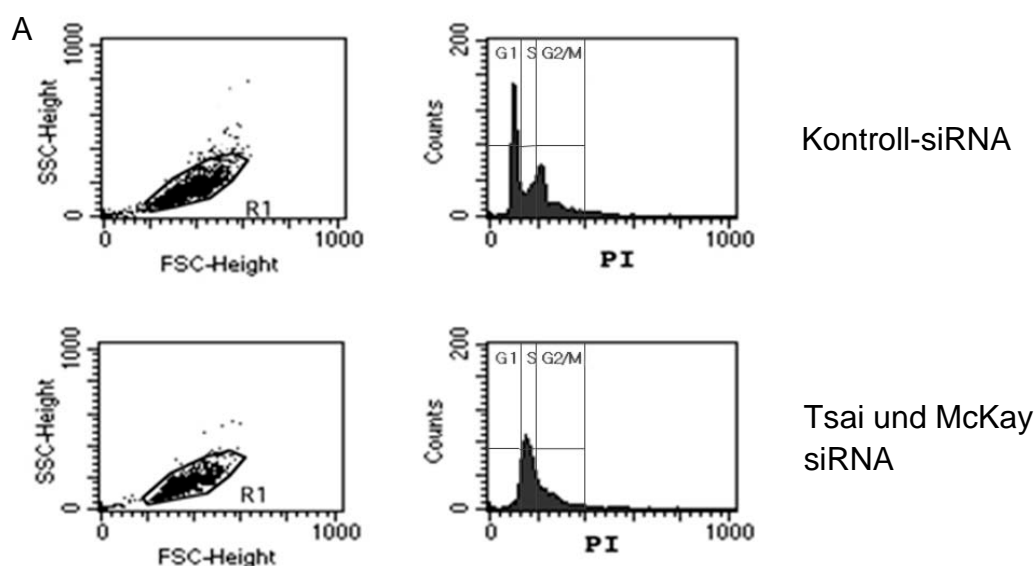


Abbildung 15 Der *knock-down* von *nst* induziert eine Stabilisierung von nukleärem p53.

(A) U2OS-Zellen wurden mit den entsprechenden siRNAs zweimal transfiziert und 24h nach der letzten Transfektion in Laemmli-Puffer lysiert. Der Proteingehalt jedes Lysates wurde an die Aktin-Proteinmenge angepasst. Es folgte die Immundetektion von Pes1, NST und p53. (B) Transfizierte U2OS-Zellen wurden mit PFA fixiert und p53 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

3.2.4 Der *nst* knock-down induziert einen G1/S-Phase Zellzyklusarrest

Der durch *nst* knock-down induzierte Proliferationsdefekt und die gleichzeitige Stabilisierung des p53-Proteins lassen auf einen p53-vermittelten Zellzyklusarrest schließen. Die Herabregulation von *bop1*, *pes1* oder *wdr12* via RNAi resultiert ebenfalls in einem reversiblen, p53-induzierten G1/S-Phase-Arrest, der in entsprechenden Zellzyklus-FACS-Analysen nachgewiesen werden konnte (Holzel et al., 2005; Grimm et al., 2006, Strezoska et al., 2002). Welche Art von Zellzyklusarrest induziert der *nst* knock-down?



B

Kontroll-siRNA		Tsai und McKay siRNA	
Zellzyklusphase	% Anteil an R1-Zellen	Zellzyklusphase	% Anteil an R1-Zellen
G1	49,4	G1	23,0
S	15,7	S	41,4
G2/M	34,9	G2/M	35,6

Abbildung 16 Der knock-down von *nst* induziert einen G1-Zellzyklusarrest.

(A) Repräsentative Punktdiagramme und Histogramme der Zellzyklus-FACS-Analyse. Dargestellt ist eine Zellpopulation in einem Zellgröße (FSC) - Zellgranularität (SSC) Diagramm, welche mit der angegebenen siRNA transfiziert worden ist. Eine distinkte Population wurde mit dem Polygon R1 ausgewählt. Das korrespondierende Histogramm zeigt die R1-Zellpopulation mit entsprechendem PI (Propidiumiodid)-Gehalt. Die Phasenbegrenzer G1-, S- und G2/M dienen zur Quantifizierung (B) Quantifizierung der Zellzyklusphasenverteilung. Im Polygon R1 sind 100% der im Histogramm dargestellten Zellen enthalten. Die durch die Phasenbegrenzer G1-, S- und G2/M definierten Bereiche enthalten den angegebenen prozentualen Anteil an Zellen der Gesamtpopulation.

Nach Transfektion der Kontroll-siRNA proliferieren die Zellen unverändert weiter, was anhand der durchgeführten Proliferationsexperimente und der typischen Zellzyklusphasen-Verteilung der Zellen erkennbar ist (Abbildung 16A). Es sind sowohl Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (G1-Zellzyklusphase), als auch Zellen mit zweifachem DNA-Gehalt detektierbar (G2/M-Zellzyklusphase). Diese typische Zellzyklusphasenverteilung liegt nach *nst* siRNA Transfektion nicht mehr vor. Die G2/M-Verteilungsspitze ist nicht mehr beobachtbar, jedoch lässt sich ein Flächenzuwachs der S-Phasen-Verteilungsspitze feststellen. Die entsprechende Quantifizierung bestätigt diese Beobachtung (Abbildung 16B). Daraus lässt sich schließen, dass der *knock-down* von *nst* einen G1/S-Zellzyklusarrest induziert.

3.2.5 Der *knock-down* von *nst* verursacht einen 32S rRNA Prozessierungsdefekt

NST lokalisiert im Nukleolus, einem Kompartiment, indem hauptsächlich Ribosomenbiogenese und die dafür notwendige Prozessierung der rRNA stattfindet. Des Weiteren fungiert das Hefe-Homolog NUG1 als ribosomaler Exportfaktor und rRNA-Prozessierungsfaktor, der an der Reifung und am Transport von 60S-präRNPs beteiligt ist (Bassler et al., 2001). Daraus ergibt sich die Frage, ob NST an der Prozessierung der rRNA beteiligt ist?

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die rRNA-Prozessierung nach erfolgtem *nst knock-down* kontrolliert. Dazu wurden Zellen zweimal mit *nst* siRNA transfiziert und 24h nach der letzten Transfektion mit (³²P)-Orthophosphat inkubiert. Diese direkte *in vivo* Markierung der RNA hat den Vorteil, dass unmittelbare Effekte des *nst knock-downs* auf *de novo* rRNA-Prozessierung überprüft werden können und vor dem *knock-down* präexistierende RNA nicht interferiert. Die so radioaktiv markierte RNA wurde isoliert, in einem denaturierenden Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert.

Der *knock-down* von *nst* induziert einen 32S rRNA Prozessierungsdefekt (Abbildung 17). Vergleicht man das rRNA-Profil von Kontroll- und *nst*-siRNA transfizierten Zellen, so fällt auf, dass die Menge an 28S rRNA nach Herabregulation von *nst* stark verringert ist. Auch akkumuliert die 32S rRNA in *nst knock-down* Zellen.

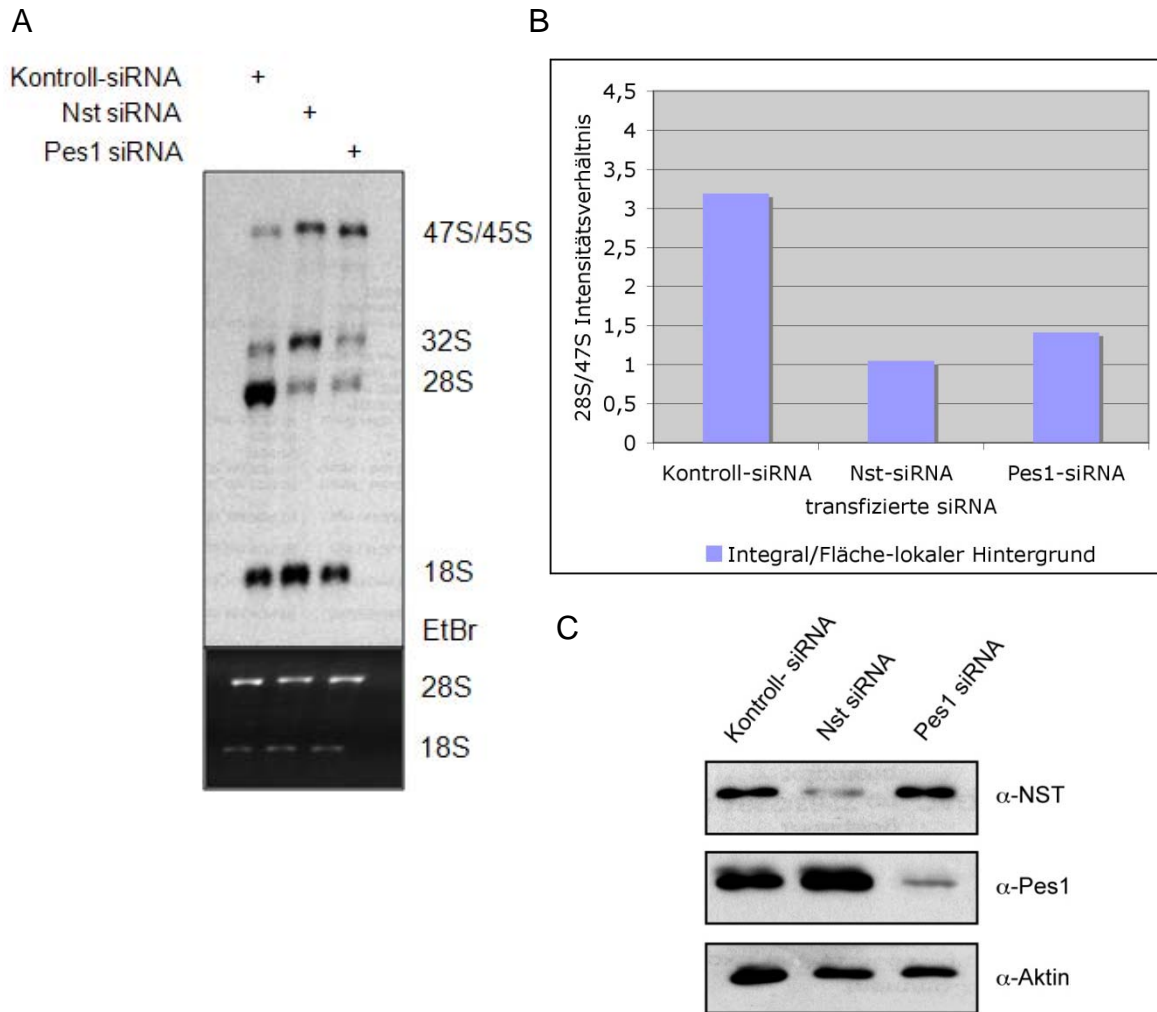


Abbildung 17 Der *knock-down* von *nst* induziert einen 28S rRNA-Prozessierungsdefekt

(A) Gelelektrophoretisch aufgetrennte, autoradiographisch detektierte ribosomale RNA von U2OS-Zellen, die zweimal mit der angezeigten siRNA transfiziert worden sind. Die 47S- und 45S-rRNA Vorläuferform kann aufgrund eines zu geringen Größenunterschiedes nicht aufgelöst werden. Die gleichmäßige Beladung aller Spuren mit RNA kann anhand der Etidiumbromid-Färbung überprüft werden. (B) Quantifizierung der rRNA-Bandenintensitäten, dargestellt als Histogramm. Um Effekte aufgrund ungleichmäßiger Beladung zu minimieren, wurde das Verhältnis der Signalintensitäten der 47S/45S rRNA und 28S rRNA berechnet. Die Signalintensitäten stellen Messwerte aus einer Integralmessung dar, von denen ein lokaler Signalhintergrund subtrahiert wurde. (C) Der durch siRNA Transfektion induzierte *knock-down* von NST und Pes1 wurde auf Proteinebene verifiziert.

Nach erfolgtem *pes1 knock-down* ist dies jedoch nicht beobachtbar. Eine durchgeführte Quantifizierung der Autoradiographie-Signale normiert die entsprechenden 28S-Signale auf 47S rRNA-Mengen und reduziert somit mögliche Sekundäreffekte aufgrund unterschiedlicher Beladung (Abbildung 17B).

Nach Herabregulation von *nst* ist eine Reduktion der 28S rRNA im Vergleich zur Kontrollsituation um den Faktor 3 beobachtbar. Die NST- und Pes1-Proteinmenge werden durch die entsprechende siRNA-Transfektionen signifikant reduziert (Abbildung 17C).

3.3 Funktionelle Analyse der *nst* Mutanten in der rRNA-Prozessierung

Ein RNAi-vermittelter *knock-down* eines Gens resultiert in den meisten Fällen in einem Phänotyp, welcher Rückschlüsse auf die Funktion des korrespondierenden Proteins zulässt. Viele Proteine sind jedoch aufgrund ihrer intramolekularen Domänenstruktur oder ihrer Beteiligung an unterschiedlichen Proteinkomplexen multifunktionell. Mit der temporären Herabregulierung eines Gens können all diese Funktionen nicht mehr erfüllt werden bzw. entsprechende, funktionelle Proteinkomplexe können sich gar nicht mehr bilden. Somit besteht die Gefahr einen *knock-down* Phänotyp zu provozieren, der eine Mischung mehrerer einzelner Phänotypen darstellt. Des Weiteren können siRNAs eine unspezifische Kreuzreaktivität für andere mRNAs besitzen, die nicht herabreguliert werden sollen (sog. siRNA *off target* Effekt; Du et al., 2005; Birmingham et al., 2006). Zur Kontrolle der *off target* Effekte der *knock-down* Phänotypen eignet sich ein so genannter *knock-in* Ansatz. Dabei werden nach erfolgtem *knock-down* eines Gens das Wildtyp-Gen bzw. Mutanten des Gens exprimiert und die funktionale Rekonstitutionsfähigkeit letzterer in einem entsprechenden biologischen Prozess überprüft. Kann die Expression des Wildtyp-Gens den *knock-down* Phänotyp rekonstituieren, so können *off target* Effekte in diesem untersuchten biologischen Prozess ausgeschlossen werden. Des Weiteren erlaubt diese Technik unter Zuhilfenahme von Mutanten, die Identifizierung von Domänen abhängigen Funktionen. So kann z.B. die kleinste, noch funktionserfüllende Proteinuntereinheit ermittelt werden.

3.3.1 Experimentelles Vorgehen

Um endogenes *nst* in einem *knock-down knock-in* Experiment herabzuregulieren, bieten sich 2 verschiedene Techniken an. Die *klassische* Methode ist die der siRNA-Transfektion. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mittels einer Vektor-basierten Expression von shRNA (*short hairpin RNA*) oder

miRNA (*micro RNA*) den *knock-down* zu vermitteln. Für ein *knock-down knock-in* Experiment mit den *nst* Mutanten wurde die Methode der Vektor basierten Expression einer *nst* spezifischen miRNA verwendet. Die Verwendung eines Vektor basierten *knock-down* Systems bietet die Möglichkeit, eine lang anhaltende Herabregulation der mRNA in Zellen unbegrenzter Menge herzustellen. Gerade bei Experimenten, die hohe Ausgangszellzahlen erfordern wie z.B. Immunpräzitationsanalysen, ist ein Vektor basiertes *knock-down* System einer transienten siRNA Transfektionsstrategie überlegen. Warum wurde gerade ein miRNA *knock-down* System gewählt? Es bietet gegenüber der shRNA basierten Herabregulierung mehrere Vorteile. So besitzt eine einzelne Kopie eines miRNA Vektors eine signifikant höhere *knock-down* Penetranz als ein entsprechender shRNA-Vektor (Stegmeier et al., 2005). Des Weiteren lässt sich die Expression von miRNA-RNAi-Kassetten mit Hilfe eines RNA-Polymerase-II Promotors steuern (Mittal, 2004). Diese Eigenschaft erlaubt die Klonierung einer entsprechenden miRNA-RNAi-Kassette in den bereits für Überexpressionsstudien verwendeten, konditionalen pRTS-1 Vektor. Somit ist das Expressionsniveau der miRNA über die Konzentration des Induktors Doxycyclin steuerbar.

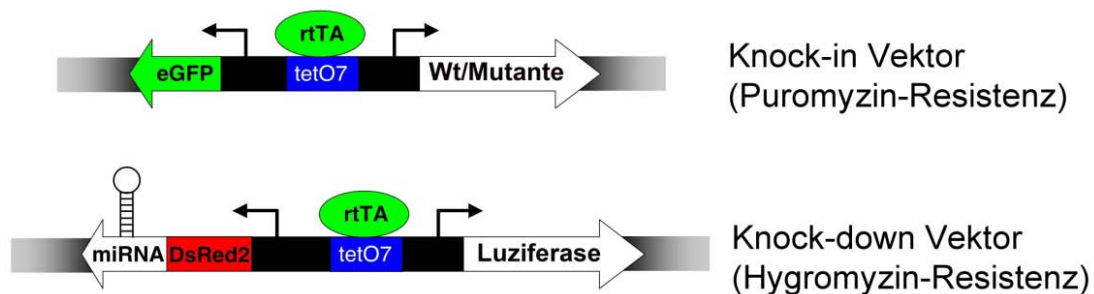


Abbildung 18 Ein Vektor basiertes *knock-down knock-in* Experiment

Der *knock-in* Vektor besitzt einen bidirektionalen, Tetracyclin responsiven Promotor, der mittels eines reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivators aktiviert werden kann. Nach Aktivierung erfolgt die Expression des Wildtyp-Gens bzw. einer Mutante und eines eGFP-Reporterproteins. Letzteres kann für eine mikroskopische Kontrolle der Expression herangezogen werden. Der *knock-down* Vektor besitzt ebenfalls einen Tetracyclin responsiven, bidirektionalen Promotor, der nach Aktivierung ein Luziferase- und ein miRNA/DsRed2 (rot fluoreszierendes Reporterprotein) Gen gleichzeitig exprimiert. Beide Vektoren unterscheiden sich in ihren Antibiotikaresistenz-Genen. (Modifizierte Abbildung aus Holzel et al., 2007b).

Eine Grundvoraussetzung für ein *knock-down knock-in* Experiment ist, dass die verwendete miRNA/siRNA/shRNA nur die endogen exprimierte mRNA degradiert, nicht aber die exogen exprimierte Wildtyp- oder mutierte Form des Gens. Um dies zu gewährleisten, werden meistens RNAi-Zielsequenzen in den untranslatierten Bereichen der endogenen mRNA gewählt, die nicht in dem ektopisch exprimierten Wildtyp-oder Mutanten-Gen enthalten sind. Auch sollten der *knock-down* Vektor und der *knock-in* Vektor unterschiedliche Antibiotika-Resistenzgene tragen, wodurch eine stabile Zelllinie mittels Doppelselektion mit zwei unterschiedlichen Antibiotika hergestellt werden kann. Diese Zelllinie wird dann mit dem Induktor Doxycyclin für 4-7 Tage inkubiert. Zur Überprüfung der Rekonstitutionsfähigkeit der Mutanten in dem Prozess der Ribosomenbiogenese folgt eine *in vivo* Pulsmarkierung der zellulären RNA mit Hilfe von (^{32}P)-Orthophosphat, die dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert wird.

3.3.2 Etablierung und Evaluierung eines Vektor-basierten *knock-down knock-in* Systems

Eine entsprechende miRNA Zielsequenz-Identifizierung in der *nst* mRNA erfolgte mit Hilfe eines Suchalgorithmus der Firma Invitrogen (<http://rnaidesigner.beta.invitrogen.com>). Die Suche begrenzte sich dabei auf die untranslatierten Bereiche der mRNA (3'UTR und 5'UTR; siehe Material und Methoden). Eine identifizierte 5'UTR miRNA Zielsequenz wurde in einen pRTS-1 Vektor einkloniert, welcher ein Puromycin-Resistenzgen besitzt. Das Wildtyp-*nst* Gen und entsprechende Mutanten wurden hingegen in ein pRTS-1-Plasmid eingefügt, welches eine Hygromycin-Resistenz vermitteln kann. Somit konnten mit einer Hygromycin/Puromycin Doppelselektion Zellen angereichert werden, welche sowohl die 5'UTR miRNA, als auch das Wildtyp-Gen (oder entsprechende Mutanten) konditional exprimieren können.

Zur Ermittlung der optimalen Induktionsdauer des *knock-down* Vektors wurde ein Pilot-Experiment über mehrere Tage durchgeführt und die Herabregulation des NST-Proteins quantifiziert. Nach 5-tägiger Induktionszeit des pRTS-miNST-Vektors ist das NST-Protein praktisch nicht mehr detektierbar (Abbildung 19). Somit scheint eine Induktionsdauer von 5 Tagen für einen erfolgreichen *nst knock-down* mittels miRNA ausreichend zu sein.

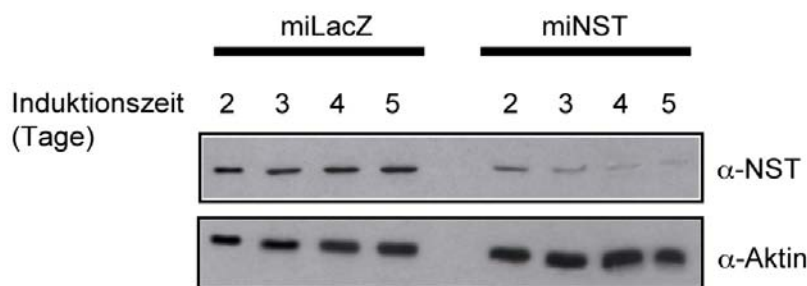


Abbildung 19 Zeitlicher Verlauf der miRNA vermittelten Herabregulierung des NST-Proteins

Ein pRTS-Vektor, der eine miRNA gegen *nst* exprimiert, wurde für den angegebenen Zeitraum mit Doxycyclin induziert. Die Herabregulation von NST wurde per Immundetektion überprüft. Als Negativkontrolle diente ein pRTS-Vektor, der eine miRNA gegen β -Galaktosidase- (LacZ) exprimiert.

Mit diesem Wissen wurde ein entsprechendes *knock-down knock-in* Experiment mit anschließender radioaktiver Pulsmarkierung der zellulären RNA durchgeführt. Der entsprechende siRNA vermittelte *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Ebene sollte somit reproduziert und durch gleichzeitige Expression des *nst* Wildtyp-Gens rekonstituiert werden.

A

B

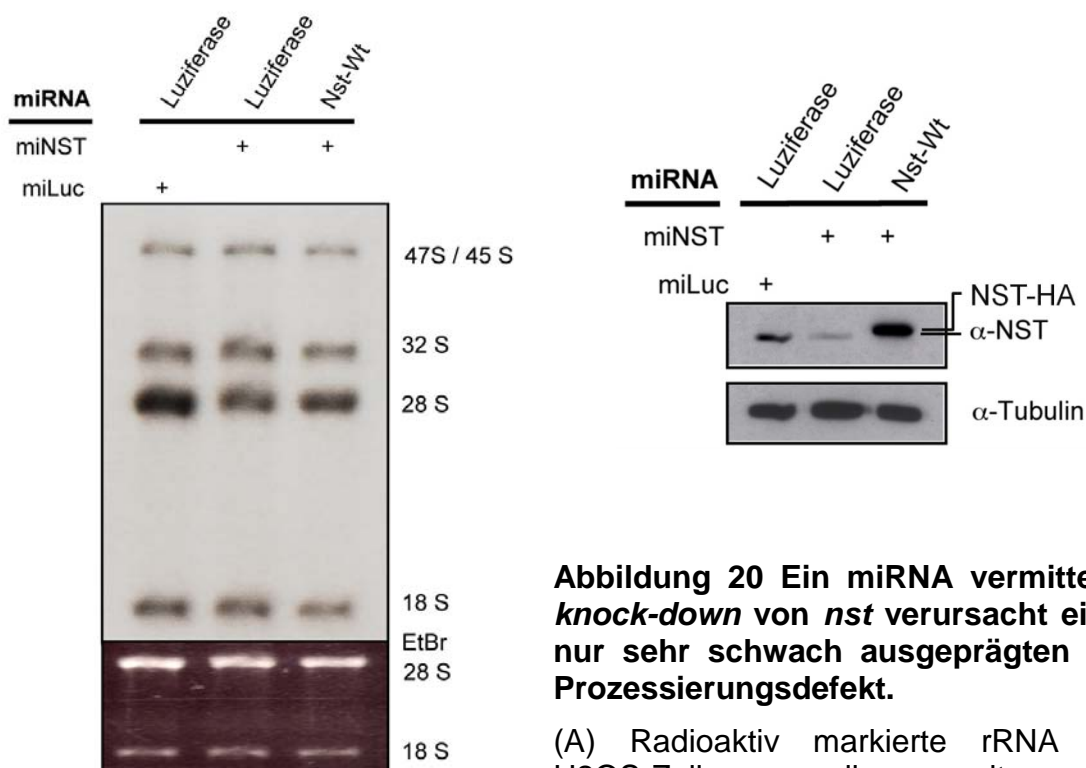


Abbildung 20 Ein miRNA vermittelter *knock-down* von *nst* verursacht einen nur sehr schwach ausgeprägten 32S Prozessierungsdefekt.

(A) Radioaktiv markierte rRNA von U2OS-Zellen, die mit den entsprechenden pRTS-1 Vektoren stabil selektiert worden sind. Die Konstrukte wurden mit Doxycyclin für 5 Tage induziert. Die Etidiumbromid-Färbung dient zur Kontrolle der Gesamt-RNA Beladung. (B) *knock-down knock-in* Experiment auf Proteinebene.

Die gleichzeitige Expression von exogenem Wildtyp-Protein resultiert in einer Protein-Bande, die ein geringfügig höheres Molekulargewicht, als das endogene NST-Protein besitzt (Abbildung 20B; Spur 3). Dieser Unterschied in der gelelektrophoretischen Mobilität ist auf das Hämagglutinin-Epitop zurückzuführen. Jedoch ist zu erkennen, dass trotz der Herabregulation des NST-Proteins der 32S-Prozessierungsdefekt nur sehr schwach ausgeprägt ist (Abbildung 20A; Spur 2). Somit kann auch die Frage nach einer Rekonstituierbarkeit dieses *knock-down* Phänotypes nicht abschließend beantwortet werden.

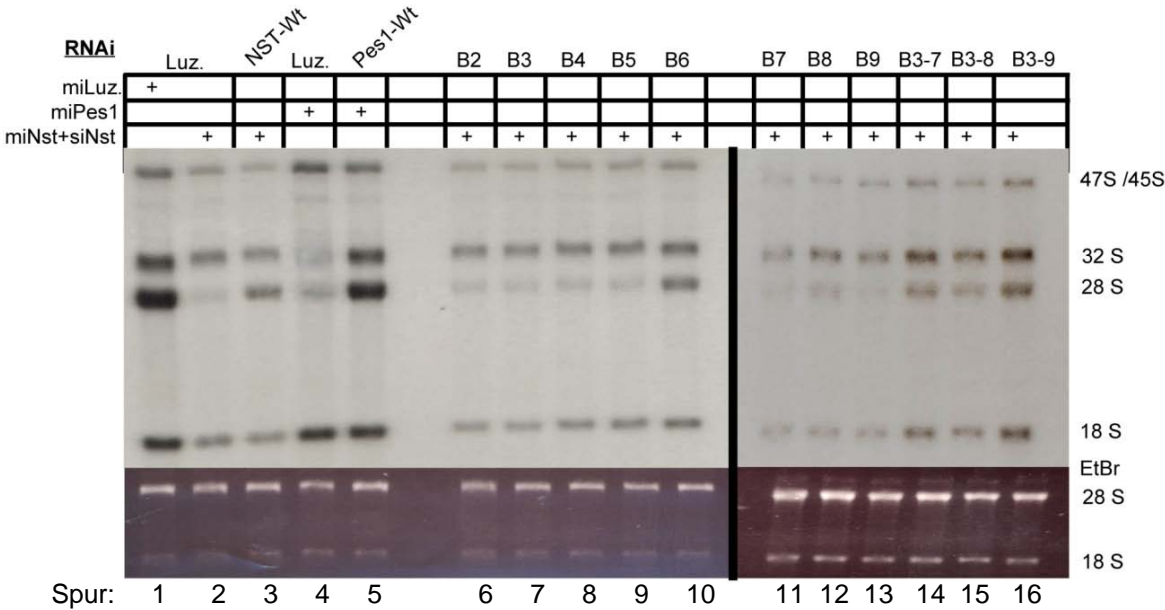
Bleibt zu erwähnen, dass die Verwendung von Selektions- und Induktionsantibiotika keinen erkennbaren Effekt auf die rRNA-Prozessierung haben und dieses Vektor-basierte *knock-down knock-in* System somit für die Untersuchung dieses zellulären Prozesses grundsätzlich geeignet ist (Abbildung 20A; Spur 1).

3.3.3 Der N-Terminus von NST kann den *knock-down* Phänotyp auf rRNA-Ebene rekonstituieren

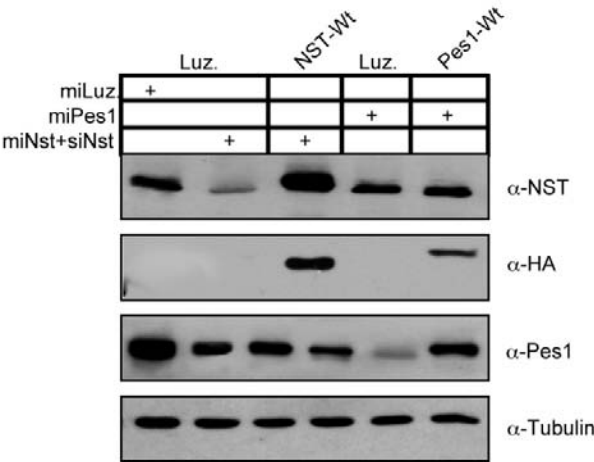
Der siRNA vermittelte *knock-down* Phänotyp auf rRNA-Ebene ist im Vergleich mit der miRNA basierten *nst* Herabregulation sehr viel stärker ausgeprägt. Um dennoch von den Vorteilen eines Vektor-basierten *knock-down* Systems zu profitieren und um die *knock-down* Effizienz der Dharmacon siRNA zu steigern, wurden beide Techniken kombiniert. Nach der Induktion der Vektoren mit Doxycyclin für 5 Tage erfolgte anschließend eine zweimalige Transfektion der Zellen mit der Dharmacon siRNA. Die Kombination beider Techniken birgt natürlich das Risiko in sich, dass sich eventuell auftretende *off-target* Effekte addieren. Dies lässt sich aber in einem *knock-down knock-in* System relativ einfach evaluieren, da die Rekonstitutionsfähigkeit des Wildtyp-Proteins Aufschluss über die Spezifität des *knock-downs* und das Vorliegen eines zusammengesetzten, multifaktoriellen Phänotyps gibt.

In Abbildung 21 ist das Ergebnis eines repräsentativen *knock-down knock-in* Experimentes abgebildet. Endogenes NST- und Pes1-Protein werden durch die miRNA/siRNA-Kombination erfolgreich herabreguliert (Abbildung 21B). Auch sind deutliche HA- und NST-Signale der Mutanten detektierbar (Abbildung 21C, D, E). Allerdings werden die Mutanten B2 und B6 vom NST-Antikörper

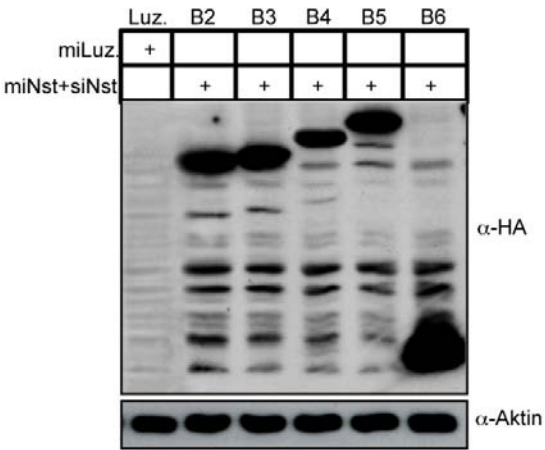
A



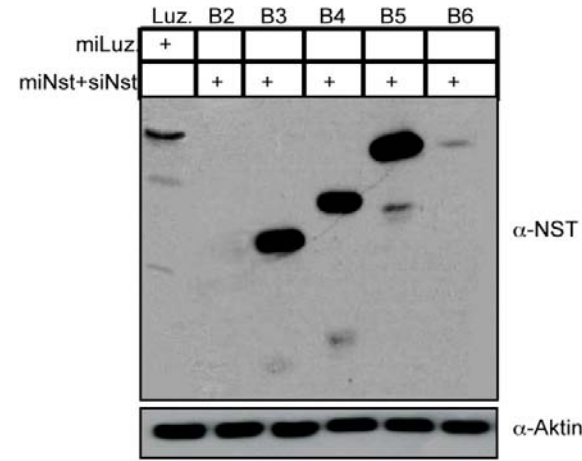
B



C



D



E

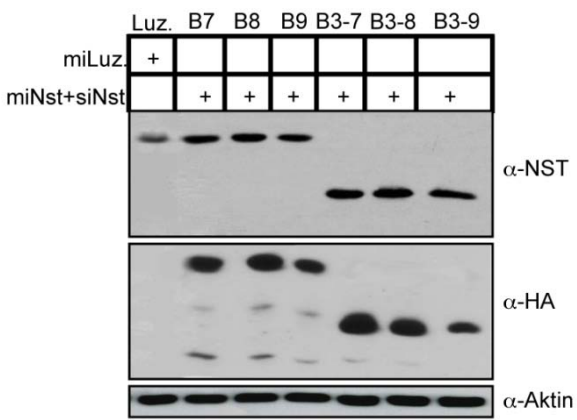


Abbildung 21 Die B6-Mutante rekonstituiert rRNA-Prozessierung nach *nst* knock-down.

(A) Radioaktiv markierte RNA von U2OS-Zellen nach RNAi-knock-down von *nst*. (miRNA-Vektor Induktion für 5 Tage, zweimalige siRNA-Transfektion). Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Rekonstitution diente ein *knock-down knock-in* von Pes1 (Spur 4 und 5). Die Etidiumbromid-Färbung dient als Ladungskontrolle. (B),(C),(D): Kontrollen für das *knock-down knock-in* Experiment auf Proteinebene. Endogenes NST-Protein wurde mit dem α -NST-Antikörper-, exogen exprimiertes NST mit einem α -Hämagglutinin-Antikörper und endogenes Pes1 mit einem α -Pes1-Antikörper detektiert. Aktin- und Tubulin dienten als Ladekontrollen.

nicht erkannt, weil sie nicht das Antikörper-Epitop (saure Domäne) kodieren (Abbildung 21D).

Die kombinierte Verwendung von Vektor-basierter α -*nst*-miRNA und transient transfizierter siRNA erzeugt einen ausgeprägten 28S rRNA-Prozessierungsdefekt (Abbildung 21A, Spur 2). Bei gleichzeitiger Expression des Wildtyp-Proteins wird dieser *knock-down* Phänotyp rekonstituiert (Spur 3). Somit ist diese miRNA/siRNA-knock-down-Kombination spezifisch für NST und erzeugt zumindest im zellulären Prozess der rRNA-Reifung keine *off-target* Effekte. Zu Vergleichszwecken wurde der Pes1 *knock-down* Phänotyp durch Ko-Expression des Pes1-Wildtyp-Proteins ebenfalls rekonstituiert (Spur 4 und 5). Der Grad der Rekonstituierbarkeit des Prozessierungsdefektes ist bei Pes1 ausgeprägter als bei NST (Vergleiche 28S rRNA Bandenintensität in Spur 3 und 5). In den Spuren 6-11 wurde die Rekonstitutionsfähigkeit der *nst* Deletionsmutanten B2-B6 getestet. Nur die Expression der B6-Mutante ist in der Lage, ein annäherndes 1:1 Verhältnis von 28S- und 32S-RNA zu erzeugen, vergleichbar mit dem rRNA-Profil nach Ko-Expression des NST Wildtyp-Proteins (Spur 10). Die Expression der Punkt- und Doppelmутanten B7 - B3-9 (Spur 11-16) erzeugt nicht signifikante Rekonstitutionsphänotypen. Zwar verursacht die exprimierte Mutante B3-9 am ehesten eine Rekonstitution der 28S rRNA-Bande, allerdings ist immer noch eine deutlich höhere Intensität der 32S rRNA-Bande beobachtbar (Spur 16).

3.3.4 Optimierung der *knock-down knock-in* Bedingungen

Obwohl die Kombination aus Vektor-basierter miRNA-Expression und transienter siRNA-Transfektion das endogene NST-Protein sehr spezifisch herabregulierte, war die experimentelle Durchführung dieser Kombinationstechnik sehr

aufwendig. Ein Hauptproblem vieler Reproduktionsexperimente war die zu geringe RNA-Gesamtmenge, die aus den Zell-Totallysaten isoliert werden konnte. Um die RNA Ausbeute zu erhöhen, kann natürlich das Experiment in einem größeren Format mit höheren Zellzahlen durchgeführt werden. Allerdings sinkt dadurch die Transfektionseffizienz der siRNA erheblich und die Handhabung der radioaktiven Zellkulturmaterialien wird zunehmend impraktikabel.

Morphologisch zeigten die behandelten Zellen keine Auffälligkeiten und es konnte auch keine signifikant erhöhte Apoptoserate, erkennbar anhand von abgerundeten, nicht mehr adhärenen Zellen, festgestellt werden, was die geringe RNA-Menge hätte erklären könnte (nicht gezeigte Daten). Die Proliferationsgeschwindigkeit der stabil selektierten Zelllinien reduzierte sich jedoch nach Vektor-Induktion mit Doxycyclin erheblich. Die Vermehrung der Zellen ist allerdings notwendig, um die, für die Gelelektrophorese minimal-notwendige Menge an RNA, zu erhalten. Die Kombination der beiden Selektionsantibiotika (Puromycin und Hygromycin; beide wirken inhibitorisch auf Proteinbiosynthese) mit dem Induktor-Antibiotikum Doxycyclin kann unter anderem für die geringe Proliferationsgeschwindigkeit der sehr stress-sensitiven U2OS-Zelllinie verantwortlich sein. Um nur ein Selektionsantibiotikum verwenden zu müssen und um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein *knock-down knock-in* Experiment etabliert, welches sich nur der transienten siRNA-Transfektionstechnik bedient. Dafür war es jedoch notwendig, die *knock-down* Effizienz der Dharmacon siRNA zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde die initiale Zellzahl für einen siRNA *knock-down* optimiert. Des Weiteren sollte die geringste Doxycyclin-Konzentration für eine ausreichende Vektor-basierte Expression der *nst* Mutanten ermittelt werden. Somit konnten potenziell proliferationsinhibierende Effekte von Doxycyclin minimiert werden. Die Reduktion der initial verwendeten Zellzahl eines siRNA-Transfektionsexperimentes resultiert in einer höheren *knock-down* Effizienz des Dharmacon-Oligonukleotids (Abbildung 22). Auf Proteinebene ist eine deutlichere Herabregulation des NST-Proteins bei geringerer Zellzahl feststellbar. Auch reduziert sich die Menge an 28S rRNA stärker, wenn nur 70000 Zellen initial für eine Einfach-siRNA-Transfektion verwendet werden.

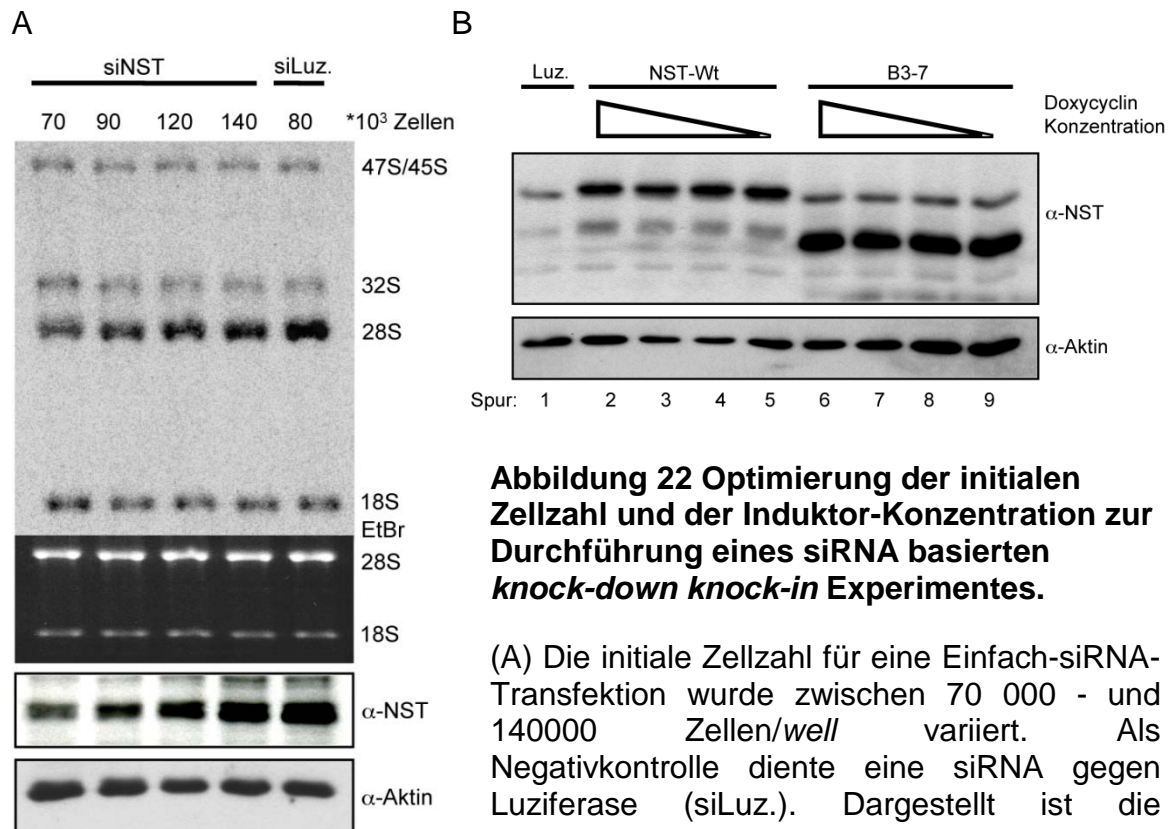


Abbildung 22 Optimierung der initialen Zellzahl und der Induktor-Konzentration zur Durchführung eines siRNA basierten knock-down knock-in Experimentes.

(A) Die initiale Zellzahl für eine Einfach-siRNA-Transfektion wurde zwischen 70 000 - und 140000 Zellen/well variiert. Als Negativkontrolle diente eine siRNA gegen Luziferase (siLuz.). Dargestellt ist die autoradiographische Detektion der radioaktiv markierten RNA inklusive einer Etidiumbromid-Färbung der Gesamt-RNA. Die Menge an NST-Protein wurde ebenfalls mittels Immundetektion evaluiert. (B) Die Doxycyclin-Konzentration wurde in einer Verdünnungsreihe, ausgehend von einer Konzentration von 1µg/ml sukzessive auf 0,100 µg/ml reduziert. Es wurde die Expression des NST-Wildtyp-Proteins (Spur 2-5) und die Expression des B3-7-Proteins (Spur 6-9) exemplarisch analysiert. Die Menge an endogenem NST-Protein ist in Spur 1 sichtbar

Auch konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Doxycyclin-Konzentration um den Faktor 10 in U2OS-Zellen in einer gleich bleibenden Proteinexpressionsstärke resultiert (Abbildung 22B). Das NST-Wildtyp-Protein und das Protein der Mutante B3-7 wird auch bei der geringsten Induktor-Konzentration genauso stark exprimiert, wie nach Verwendung der Maximalkonzentration von Doxycyclin. Mit diesem Wissen konnte nun ein *knock-down knock-in* Experiment mit den nst Mutanten durchgeführt werden, welches sich ausschließlich der siRNA-Transfektionsmethode bedient.

3.3.5 Validierung des NST N-Terminus als kleinste funktionelle Proteineinheit in der rRNA-Prozessierung

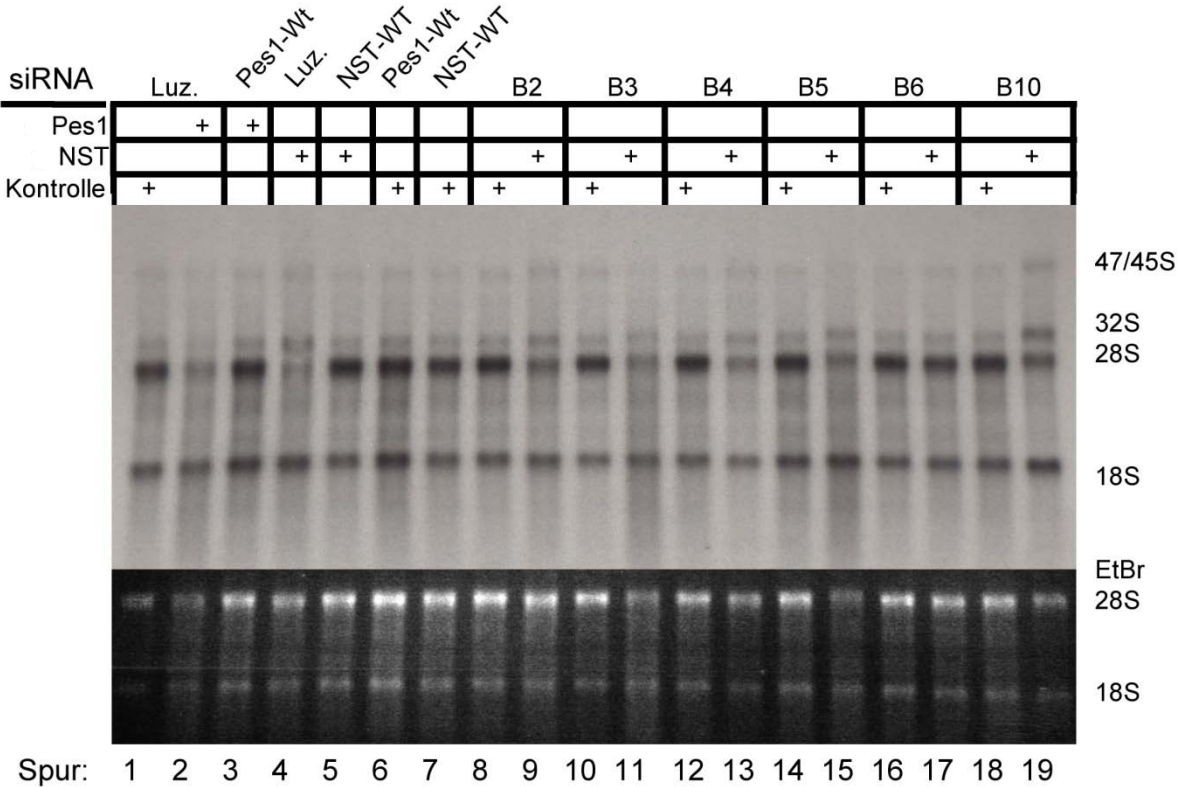
Stabil selektierte U2OS-Zellen, welche pRTS-Vektoren mit den nst-Mutanten enthalten, wurden für 3 Tage mit Doxycyclin induziert und danach in geringer

Zelldichte für ein *knock-down knock-in* Experiment ausplattiert. In den darauf folgenden 2 Tagen wurde jeweils eine Transfektion des Dharmacon Oligonukleotids vorgenommen. 48 Stunden nach der letzten siRNA-Transfektion wurde die RNA der Zellen mittels (^{32}P)- Orthophosphat pulsmarkiert. Diese RNA wurde dann in einem denaturierenden Gelsystem aufgetrennt und durch autoradiographische Detektion sichtbar gemacht.

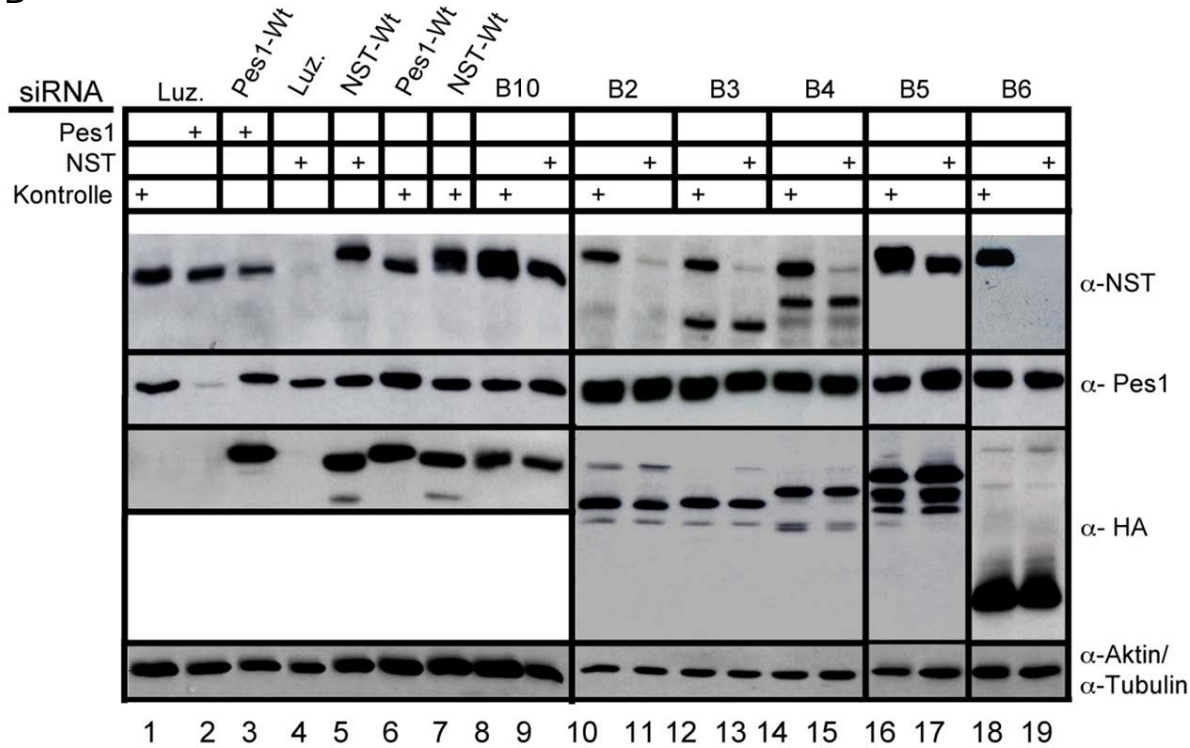
Die Rekonstitution des rRNA *knock-down* Phänotyps war sowohl für Pes1 als auch für NST erfolgreich (Abbildung 23A, vergleiche Spur 2,3 und Spur 4,5). Die Intensität der 28S rRNA-Bande in Spur 3 und 5 deutet auf eine vollständig wiederhergestellte rRNA-Prozessierung hin, vergleichbar mit der 28S rRNA-Signatur in der Kontrollsituation (Spur 1). Die Expression von Pes1- oder NST-Wildtyp-Protein nach Kontroll-siRNA Transfektion hat keinen Effekt auf die rRNA-Prozessierung (Spur 6 und 7). Vergleicht man das Intensitätsverhältnis der 32S- und 28S rRNA-Bande in den Spuren 9,11,13,15 und 19 mit dem Prozessierungsdefekt nach *nst knock-down* (dargestellt in Spur 4) so kommt man zu dem Schluss, dass die Mutanten B2, B3, B4, B5 und B10 keine Rekonstitutionsfähigkeit besitzen. Dies ist auch anhand des Quantifizierungshistogramms sehr deutlich nachvollziehbar (Abbildung 23C). Lediglich die Ko-Expression der Mutante B6 kann 28S rRNA Prozessierung wiederherstellen, vergleichbar mit der Rekonstitutionsfähigkeit des NST-Wildtyp-Proteins (Abbildung 23A, Spur 5 und Spur 17; Abbildung 23C).

Die Immundetektion von NST zeigt deutlich, dass die zweimalige Transfektion des Dharmacon Oligonukleotids in jeder Zelllinie zu einer sehr deutlichen Herabregulation des endogenen NST-Proteins führte (Abbildung 23B, Spuren 5, 9, 11,13, 15, 17 und 19). Die Expression von NST Wildtyp-Protein nach Kontroll-siRNA Transfektion resultiert in einer NST-Doppelbande, bestehend aus dem endogenem NST und dem exogen exprimierten HA-Epitop-NST-Fusionsprotein. Die Mutanten B2 und B6 werden von dem NST-Antikörper nicht erkannt, da ihnen die Epitop-kodierende Domäne fehlt. Die Expression dieser Mutanten kann aber anhand der HA-Antikörper Immundetektion bestätigt werden. Dies trifft auch auf alle anderen Mutanten zu. Bleibt zu erwähnen, dass die Transfektion der Pes1-siRNA ebenfalls zu einer deutlichen Herabregulation des Pes1-Proteins geführt hat (Abbildung 23B, Spur 2).

A



B



C

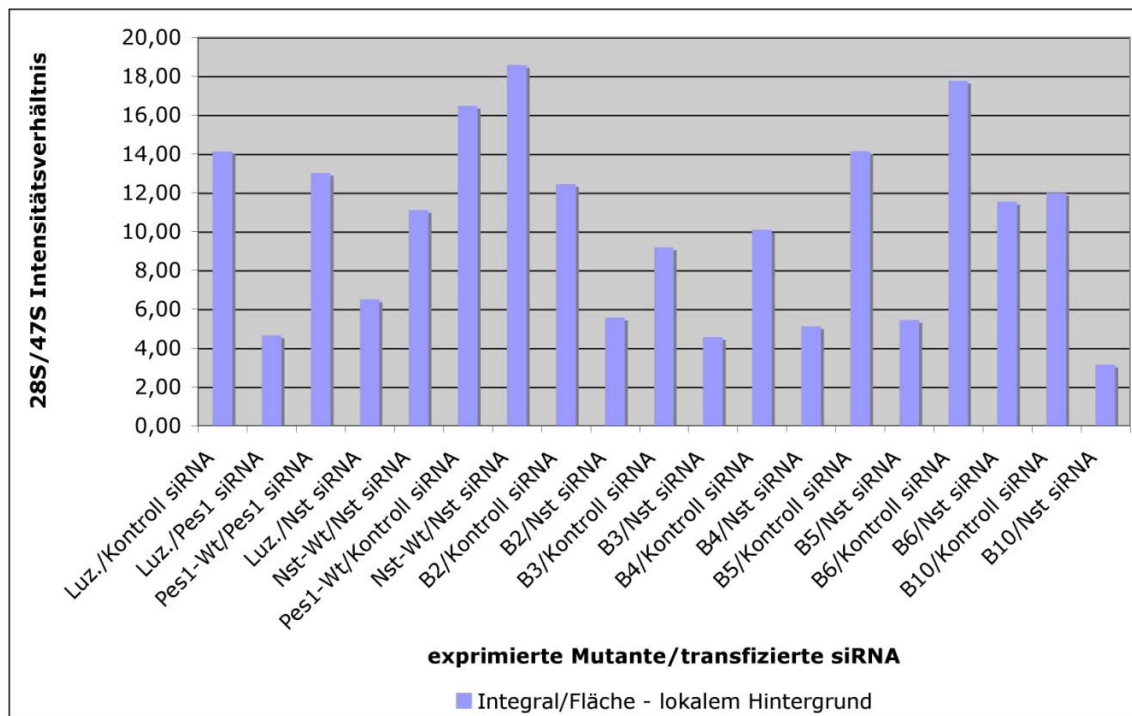


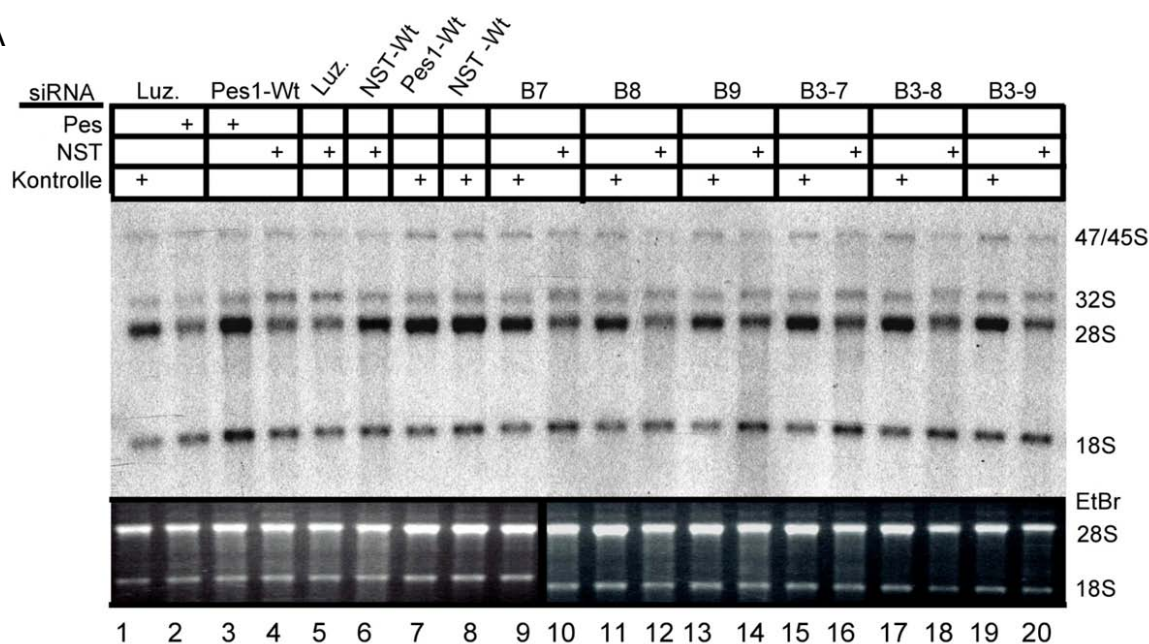
Abbildung 23 Die B6-Mutante kann den *nst* knock-down Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren.

(A) Autoradiographische Detektion von *in vivo* markierter RNA aus Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert worden sind und die die angegebenen *nst* Mutanten exprimieren. Als Positivkontrolle für einen erfolgreichen *knock-in* diente das Pes1-Gen. Die Etidiumbromid-Färbung erlaubt die Kontrolle der RNA-Beladung in jeder Gelspur. Es wurden alle existierenden Deletionsmutanten von *nst* getestet. (B) Das *knock-down knock-in* Experiment auf Proteinebene. Die Expression der Mutanten wurde mit Hilfe des NST- und des Hämagglutinin-Antikörpers überprüft. Aktin- und Tubulin- Immundetektionen dienen als Ladungskontrolle jeder Gelspur. (C) Quantifizierung der autoradiographischen Signale aus Abbildung 23A mit Hilfe eines *Phosphoimagers*. Es wurden Rechtecke gleicher Größe um alle 28S und 47S/45S rRNA Banden definiert, welche dann unter Verwendung einer Integralmessmethode quantifiziert worden sind. Lokale Hintergrundsignale wurden von den Messwerten subtrahiert.

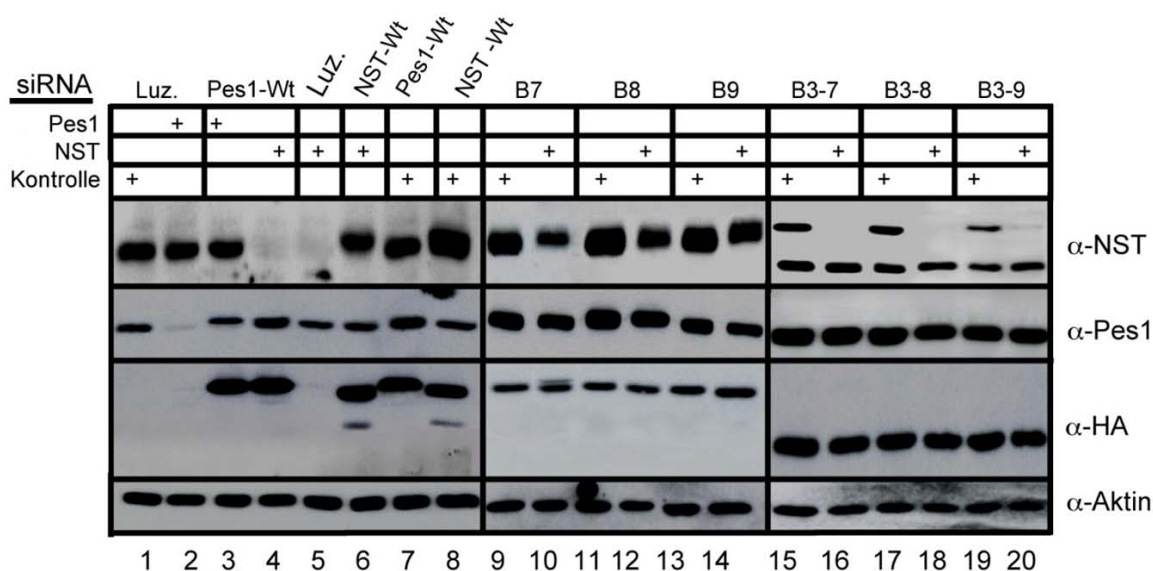
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten aus Abbildung 23 die Ergebnisse des miRNA/siRNA basierten *knock-down knock-in* Experimentes bestätigen (Abbildung 21). Ein weiteres repräsentatives Reproduktionsexperiment mit den *nst* Mutanten B5, B6 und B10 ist im Appendix einsehbar (Abbildung 29).

Auch die *nst* Punkt- und Doppelmутanten wurden in einem siRNA basierten *knock-down knock-in* Experiment auf ihre Rekonstitutionsfähigkeit getestet.

A



B



C

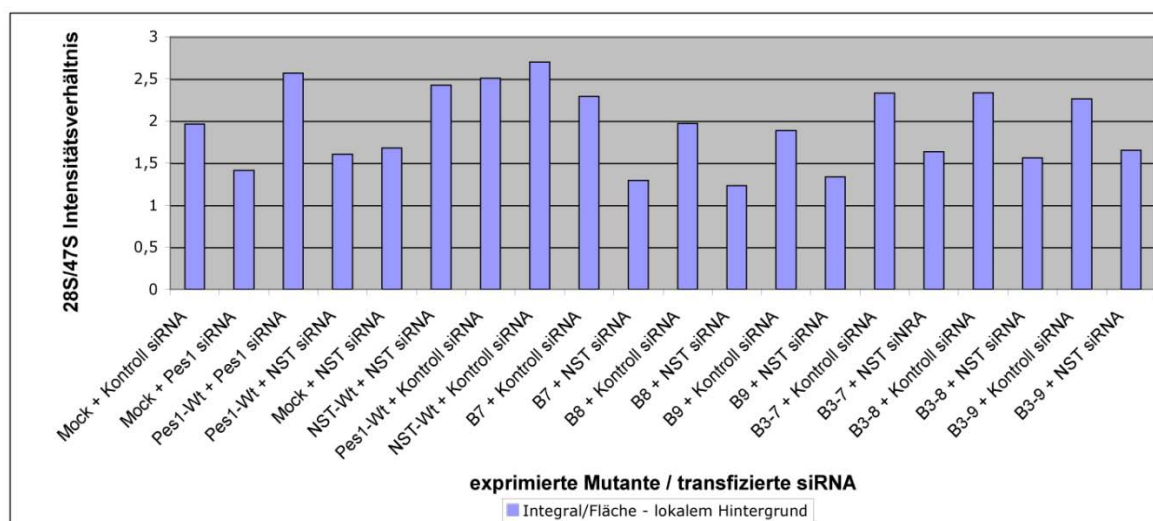


Abbildung 24 Keine der Punkt- und Doppelmutanten kann den *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Ebene rekonstituieren.

(A) Autoradiographische Detektion von *in vivo* markierter RNA aus Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert worden sind und die die angegebenen *nst* Mutanten exprimieren. Als Positivkontrolle für einen erfolgreichen *knock-in* diene das Pes1-Gen. Zusätzlich wurde die heterologe Rekonstitutionsfähigkeit von Pes1 nach *nst knock-down* überprüft (Abbildung 24; Spur 4) Es wurden alle existierenden Punkt- und Doppelmutanten von *nst* getestet. (B) Das *knock-down knock-in* Experiment auf Proteinebene. Die Expression der Mutanten wurde mit Hilfe des NST- und des Hämagglutinin-Antikörpers überprüft. Aktin-Immundetektionen dienen als Ladungskontrolle für jede Gelspur. (C) Quantifizierung der autoradiographischen Signale aus Abbildung 24A mit Hilfe eines *Phosphoimagers*. Es wurden Rechtecke gleicher Größe um alle 28S und 47S/45S rRNA Banden definiert, welche dann unter Verwendung einer Integralmessmethode quantifiziert worden sind. Lokale Hintergrundsignale wurden von den Messwerten subtrahiert.

Die Transfektion des Dharmacon-Oligonukleotids führt zu dem bereits bekannten 32S rRNA Prozessierungsdefekt, der durch Ko-Expression des NST Wildtyp-Proteins rekonstituiert werden kann (Abbildung 24A; Spur 5 und 6). Pes1 Wildtyp-Protein hingegen besitzt keine heterologe Rekonstitutionsfähigkeit bezüglich des *nst knock-downs* (Spur 4). Keine der *nst* Punktmutanten ist in der Lage, die Produktion der 28S rRNA ähnlich wie in der Kontrollsituation (Spur 1) wiederherzustellen (vergleiche Spur 10, 12, 14 und Quantifizierungsdaten in Abbildung 24B). Die Doppelmutanten B3-7, B3-8 und B3-9 rekonstituieren etwas, jedoch lässt sich die Signifikanz dieser gesteigerten Rekonstitutionsfähigkeit anzweifeln (Spur 16, 18 und 20 und Quantifizierungsdaten in Abbildung 24B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die B6-Mutante als einzige Mutante eine deutliche Rekonstitutionsfähigkeit in Bezug auf den *nst-knock-down* Phänotyp auf rRNA-Prozessierungsebene besitzt. Alle anderen Mutanten von *nst* können dies nicht, bzw. zeigen dies in einer nicht signifikanten Art und Weise.

3.4 Interaktionspartner und Ko-Sedimentationsanalyse von NST

Viele Proteine entfalten ihre volle Funktionalität erst in entsprechenden Multiproteinkomplexen mit anderen Kofaktoren, Substraten oder Interaktionspartnern. Diese auch als Quartärstruktur eines Proteins bezeichnete

Betrachtungsebene verschafft somit Einblicke in vielerlei zelluläre Prozesse, in welche das Protein involviert ist. Die experimentellen Techniken zur Analyse dieser Quartärstruktur sind vielfältig. So können proteinfokussierte Techniken, wie Immunpräzipitationen (IP) oder GST-*pull-down* Assays, aber auch Proteinkomplex-orientierte Analysemethoden, wie Massenspektrometrie oder Dichtegradientenzentrifugation, angewendet werden. Die Wahl einer entsprechenden Methode richtet sich vor allen Dingen nach der zu beantwortenden Fragestellung. In Anbetracht der erhaltenen Ergebnisse von *nst* und seinen Mutanten stellten sich zwei Fragen :

1. Ist das NST- Wildtyp-Protein und das Protein der Mutante B6 mit präribosomalen Ribonukleoproteinkomplexen (prä-RNPs) assoziiert? Dies würde eine NST vermittelte rRNA-Prozessierungsfunktion bzw. deren Rekonstituierbarkeit durch die Mutante B6 untermauern.
2. Ist NST, ebenso wie sein Hefe-Homolog NUG1, mit dem PeBoW-Komplex assoziiert? Diese Frage ist aufgrund von Koloalisation und identischen *knock-down* Phänotypen auf rRNA-Ebene legitim. Des Weiteren sollte geprüft werden, wie NST an der bereits publizierten Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 partizipiert (Huang et al., 2009; Meng et al., 2008; Dai et al., 2008).

Zur Beantwortung der ersten Frage eignet sich die Technik der Dichtengradientenzentrifugation. In einem Sucrose-Gradient kann eine Ko-Sedimentation des NST Wildtyp-Proteins und des B6-Proteins mit entsprechenden prä-RNPs schnell und effizient überprüft werden. Letztere können anhand eines typischen rRNA-Profiles, bestehend aus 28S- und 18S rRNA-Bande, leicht identifiziert werden. Die zweite Frage nach Interaktionspartnern von NST lässt sich durch Ko-Immunpräzipitationen mit entsprechenden Antikörpern eindeutig beantworten. Diese Technik setzt allerdings eine hohe Antikörperspezifität, entsprechend gewählte Isotypkontrollen und geeignete, vorher optimierte Stringenzbedingungen voraus.

3.4.1 Ko-Sedimentationsanalysen von *nst* Mutanten

Um das NST Wildtyp-Protein und das B6-Protein in einem Sucrose-Dichtegradienten zu analysieren, wurde die Fibrosarkom-Zelllinie 2fTGH mit entsprechenden pRTS-1 Vektoren stabil selektiert. Es folgte eine Induktion der Vektoren mit einer moderaten Menge Doxycyclin (0,100 µg/ml).

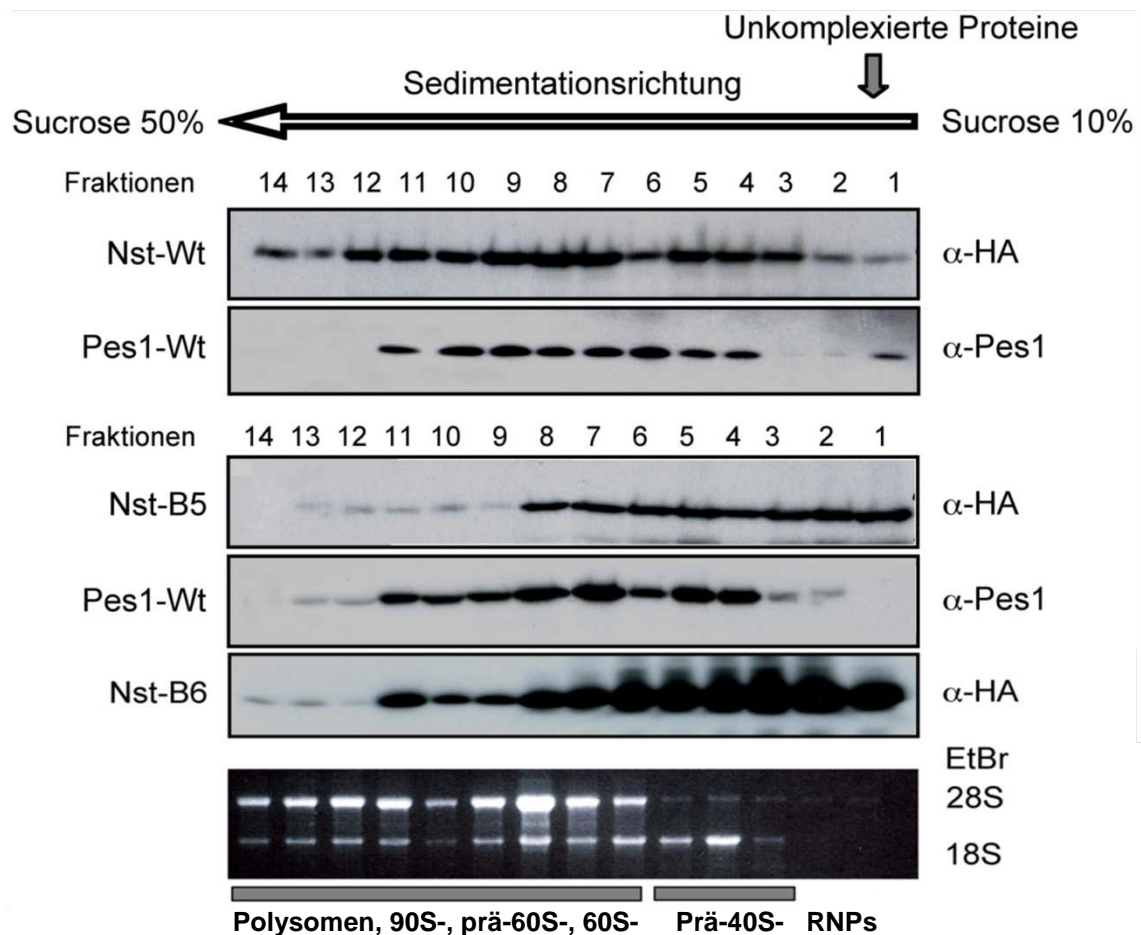


Abbildung 25 Das B6- und das NST Wildtyp-Protein kosedimentieren mit prä RNPs

Fraktionelle Proteindetektionen von NST und dem B5- und B6-Protein erfolgten mit Hilfe eines Hämagglutinin Antikörpers. Aus den Fraktionslysaten wurde ebenfalls ribosomale RNA isoliert und in einem denaturierenden Gelsystem aufgetrennt (siehe Etidiumbromid (EtBr)-Färbung). Die rRNA-Signatur lässt auf eine entsprechend beschriftete RNP-Verteilung schließen. Als Negativkontrolle für eine prä-RNP Assoziation diente die *nst*-Mutante B5. Um die Vergleichbarkeit der Ko-Sedimentationsanalysen von NST Wildtyp-Protein und den Proteinen der Mutante B5 und B6 zu gewährleisten, wurde die mit dem HA-Antikörper inkubierte Western-Blot Membran mit einem α -Pes1-Antikörper reinkubiert und die fraktionelle Verteilung von exogenem Pes1-Wildtyp-Protein exemplarisch überprüft. Freie, unkomplexierte Proteine reichern sich in Zonen niedriger Dichte an (siehe Pfeil oben rechts).

3.4.2 Ko-Immunpräzipitationsanalysen von NST

Bevor eine NST-PeBoW-Interaktion überprüft werden konnte, mussten zuerst die experimentellen Bedingungen für eine spezifische Anreicherung des NST-Proteins mit Hilfe des NST-Antikörpers im Rahmen einer Immunpräzipitation evaluiert werden. Kritische Parameter, wie die NaCl-Konzentration im

Stringenzwaschpuffer und die Inkubationsdauer des Antikörpers mit dem nativen Proteinlysate wurden so optimiert, dass das NST-Protein durch die IP im Vergleich zum *Input* spezifisch angereichert wurde bzw. die IP mit einem Isotypkontroll-Antikörper in keiner oder in einer nur sehr schwach-sichtbaren NST-Bande resultierte. Erst nach Abschluss dieser Vorexperimente wurde mit den entsprechenden Ko-Immunpräzipitationsanalysen begonnen.

Um eine Interaktion des NST-Wildtyp-Proteins mit dem PeBoW-Komplex zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationen gegen Pes1 und BOP1 durchgeführt (Abbildung 25). Obwohl endogenes NST und Pes1 durch die jeweiligen Antikörper erfolgreich angereichert (vergleiche *Input*- und IP-Spuren Nr. 3 und 7 inkl. Isotypkontrollen) und auch die bereits bekannte Pes1-BOP1 Interaktion im Immunpräzipitationsexperiment reproduziert werden konnte, gibt es aufgrund der erhaltenen Ergebnisse keine Anhaltspunkte für eine NST-Pes1 oder NST-BOP1 Interaktion (Abbildung 25). Ein weiterer nukleolärer rRNA-Prozessierungsfaktor, NOG1, dessen Hefehomolog auch mit dem PeBoW-Homologkomplex interagiert, konnte mit dem entsprechenden NOG1-Antikörper unter den verwendeten Stringenzbedingungen nicht angereichert werden. Somit lässt sich keine Aussage zu einer PeBoW-NOG1-Interaktion machen.

Mehrere Publikationen beschreiben NST als aktiven Regulator des Tumorsuppressorproteins p53 (Huang et al., 2009; Meng et al., 2008; Dai et al., 2008). Nach Angabe der Autoren wird diese Regulation über eine NST-Hdm-2 Interaktion vermittelt, die anhand eigener Immunpräzipitationsanalysen überprüft werden sollte. Es konnte keine NST-Hdm-2 Interaktion in entsprechenden *vice versa* Immunpräzipitationen nachgewiesen werden (Abbildung 25C). Beide Antikörper sind jedoch in der Lage, ihr jeweiliges Zielprotein spezifisch anzureichern. Das Hdm-2 Protein liegt in der entsprechenden IP in beiden *Spleiß*-Varianten vor (Größe ca. 80- und 90 kDa). Eine dritte Proteinbande mit einer Größe von ca. 55 kDa ist sowohl in der Input-Spur als auch in der IP-Spur vorhanden und wird durch den verwendeten Hdm-2 Antikörper kreuzreaktiv erkannt (siehe grünes Sternchen; dokumentiert im SMP14 Antikörper-Datenblatt; Sigma-Aldrich). Auch das NST-Protein wird in der NST IP spezifisch angereichert. Auffällig ist, dass das NST Protein in der Input-Spur nicht nur auf der zu erwartenden Laufhöhe von 60,5 kDa detektierbar ist, sondern dass eine

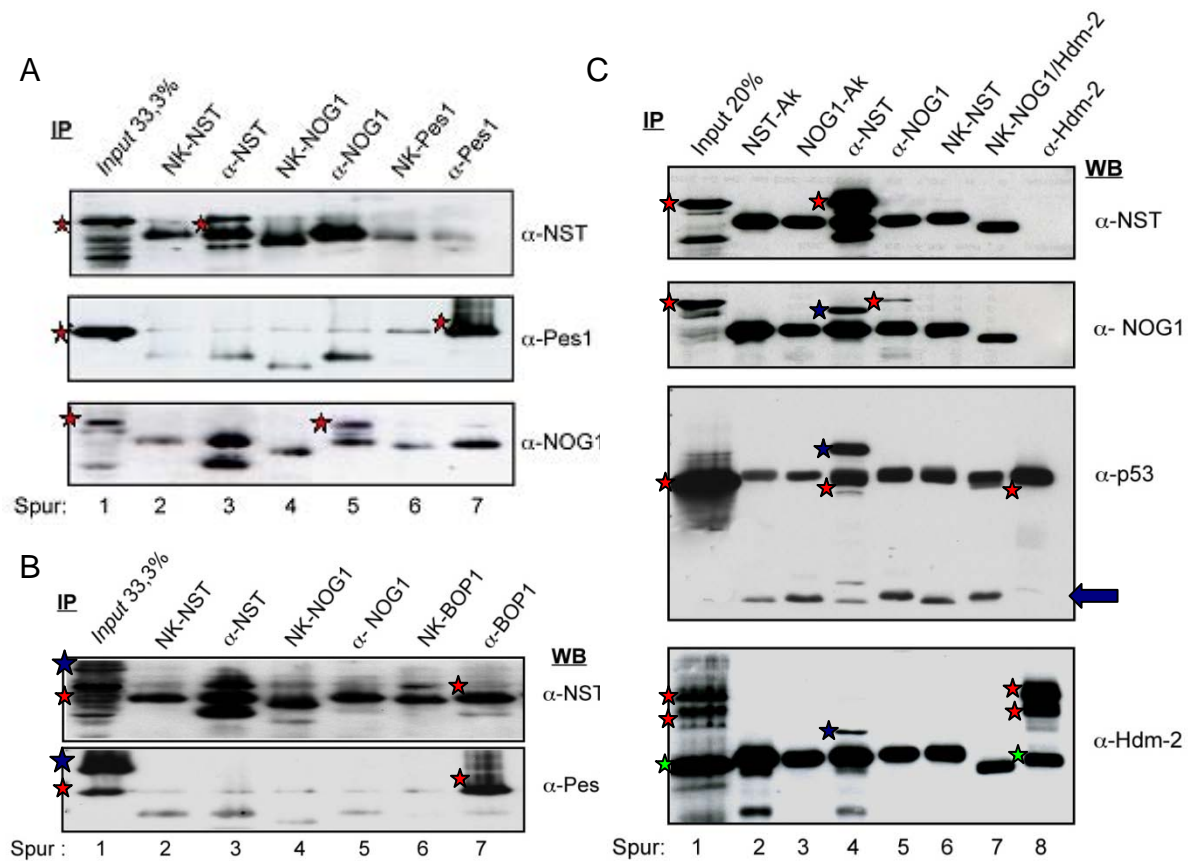


Abbildung 26 NST interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein p53, jedoch nicht mit Hdm-2, Pes1 oder BOP1.

(A) Lysate von 2fTGH-Zellen wurden für eine Immunpräzipitationsanalyse mit Antikörpern gegen NST, NOG1 und Pes1 und korrespondierenden Kontroll-Antikörper (NK-NST/ NOG1/ Pes1) inkubiert. Für jede IP wurde die gleiche Proteinmenge verwendet. Zu Kontrollzwecken wurde in die erste Spur des Gels 33,3% der Proteinmenge des Totallysates geladen (*Input*). Es folgte eine Immundetektion auf einer Western-Blot Membran mit Antikörpern gegen NST, NOG1 und Pes1. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten des Sekundärantikörpers sind die schweren Antikörper-Ketten in allen Immundetektionen sichtbar. Rote Sternchen identifizieren die gesuchten Proteine im Totallysat (Spur 1) und in der IP. (B) Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen NST, NOG1 und BOP1 inklusive entsprechender Negativkontrollen inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mit allen drei Antikörpern, lieferte aber nur für den NST- und den Pes1-Antikörper brauchbare Signale. Das Totallysat in Spur 1 ist nur unzureichend denaturiert und zeigt deshalb mehrere NST- und Pes1-Banden mit einem höheren Molekulargewicht (blaue Sternchen). (C) Die Totallysate wurden mit Antikörpern gegen NST, NOG1 und Hdm-2 inklusive entsprechender Isotypkontrollen inkubiert. Des Weiteren wurden der NST- und der NOG1 Antikörper nur mit proteinfreien Lysepuffer inkubiert (NST-Ak und NOG1-Ak). Die Immundetektion erfolgte sequenziell auf einer Western-Blot Membran (*Stripping* der Membran/Rehybridisierung) mit den Antikörpern gegen NST, NOG1, Hdm-2 und p53. Der blaue Pfeil deutet die Laufhöhe der leichten Antikörper-Ketten an. Blaue Sternchen deuten eine NST-Bande an (Spur 4), die durch unvollständiges Stripping in allen Immundetektionen sichtbar geblieben ist. Das grüne Sternchen (Spur1) markiert eine unspezifisch erkannte Bande des Hdm-2 Antikörpers.

kleinere NST-Proteinform als distinkte Bande ebenfalls sichtbar ist (Abbildung 26). Da dies sowohl in der Input-Spur als auch in der IP-Spur der Fall ist, kann auf eine möglicherweise partial degradierte NST-Form geschlossen werden. Zudem ist auch in den Immundetektionen von p53 und Hdm-2 eine NST-Bande (Spur 4) detektierbar, die trotz *Stripping* der Western-Membran sichtbar blieb.

Der NOG1-Antikörper war trotz permissiver Stringenzbedingungen (NaCl-Konzentration 100 mM) nicht in der Lage, das NOG1-Protein spezifisch anzureichern. Somit lassen sich keine Aussagen zu einer NOG1-Hdm-2 Interaktion machen.

Die bereits publizierte Interaktion von NST mit p53 konnte reproduziert werden (Abbildung 26C). Dies gelang trotz gleicher Migrationshöhe des p53-Proteins und der schweren Kette des NST-Antikörpers. Vergleicht man die NST-Immunpräzipitation mit- und ohne Zugabe des proteinreichen Totallysates (Spur 2 und Spur 4) so fällt auf, dass die Bande der schweren Antikörper-Kette auf der mit dem p53-Antikörper inkubierten Western Blot Membran in ihrer Dicke variiert. In Spur 4 wird sowohl die schwere Antikörper-Kette, als auch das p53-Protein detektiert, während in Spur 2 nur die schwere Antikörper-Kette sichtbar ist. Als Positivkontrolle für eine p53 Interaktion diente eine Hdm-2 IP (Spur 8).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Nucleostemin (NST) in der rRNA-Prozessierung mit Hilfe einer *knock-down knock-in* Strategie zu charakterisieren. Diese Strategie erlaubt neben der Validierung der Spezifität eines siRNA-vermittelten *knock-downs* auch die funktionelle Analyse von Deletions- und Punktmutanten, um notwendige Domänen für spezielle Funktionen eines Proteins zu ermitteln. Für NST konnte eine Funktion als rRNA-Prozessierungsfaktor während der Reifung der 32S rRNA nachgewiesen werden. In diesem Reifungsprozess wurde der NST N-Terminus mit seiner basischen und *Coiled Coil* Domäne als minimale Funktionseinheit identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der *knock-down* von *nst* die Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 und einen G1/S-Phase Zellzyklusarrest induziert.

4.1 NST partizipiert an der Prozessierung der 32S- in die reife 28S rRNA

Um die Funktion von NST in der rRNA-Prozessierung zu untersuchen, wurde *nst* in humanen Zellen mittels siRNA herabreguliert. Die Syntheserate des 47S-Vorläufers und die Prozessierung der 18S rRNA sind von dem *nst knock-down* nicht betroffen. Die 32S-rRNA-Zwischenform dagegen akkumuliert leicht, wie ein Vergleich des rRNA-Profils zwischen Kontrollsituation und der *knock-down* Situation zeigt. Die 28S rRNA ist um ca. den Faktor 3 verringert. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass NST an der Prozessierung der 32S-rRNA in die reife 28S rRNA beteiligt ist.

Ist die Reduktion der 28S rRNA ein direkter oder indirekter Effekt des *nst knock-downs*? Es ist möglich, dass NST als katalytisch wirkende rRNA-Endonuklease exklusiv für die Restriktion der ITS-2 Schnittstelle in der 32S-rRNA verantwortlich ist. Des Weiteren ist es denkbar, dass dieser Prozessierungsschritt in einer konzertierten Aktion mit dem NST-Interaktionspartner NPM stattfindet, welcher bereits als eine *in vitro* ITS-2 Endonuklease beschrieben worden ist (Savkur et al., 1998; Ma et al., 2008). Alternativ könnte die Abwesenheit von NST jedoch

auch zu einer Fehlprozessierung der 28S-rRNA führen (Allmang et al., 2000; Zanchin und Goldfarb, 1999). Diese falsch-prozessierte rRNA würde dann polyadenyliert und dem Exosom zum Zwecke der Degradation zugeführt werden (LaCava et al., 2005; Slomovic et al., 2006; Vanacova et al., 2007). Ob nun NST als katalytischer oder akzessorischer rRNA-Prozessierungsfaktor fungiert, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Jedoch kann die direkte oder indirekte Funktion dieses Proteins für die 28S rRNA Reifung nicht in Frage gestellt werden.

Eine weitere Auffälligkeit im rRNA-Prozessierungsmuster von NST depletierten Zellen ist das Auftreten einer 32S rRNA Akkumulation. Diese Akkumulation ist in allen *nst knock-down* Experimenten dieser Arbeit detektierbar, kann aber in den entsprechenden mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen spezifischen Phänotyp des *nst knock-downs* hin. Pes1, ein Faktor, der ebenfalls an der Herstellung der reifen 28S rRNA beteiligt ist, induziert diese Akkumulation der 32S rRNA nach RNAi vermittelter Herabregulation nicht. Ein Vergleich der rRNA-Prozessierungsmuster in NST- und Pes1 depletierten Zellen zeigt, dass die Intensität der 32S rRNA Bande in der *pes1 knock-down* Situation erheblich schwächer ist, als in Zellen, in denen *nst* herabreguliert wurde. Somit ist anzunehmen, dass NST hauptsächlich an der Prozessierung der 32S rRNA in die 28S rRNA-Form partizipiert und damit für einen anderen rRNA-Prozessierungsschritt verantwortlich ist als Pes1.

Die Beteiligung von Pes1 und NST an möglicherweise unterschiedlichen rRNA – Prozessierungsschritten könnte auch die fehlende Interaktion der beiden Proteine in den Ko-Immunpräzipitationsexperimenten dieser Arbeit erklären. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, lassen sich in der Hefe 5 prä-60S-RNPs anhand ihrer Proteinzusammensetzung und ihrer inkooperierten rRNA charakterisieren (Fatica et al., 2002; Lebreton et al., 2008). In jedem dieser Partikel werden mit Hilfe von nicht-ribosomalen Proteinen spezifische Prozessierungsschritte der rRNA katalysiert, welche exklusiv nur in einem bestimmten prä-RNP mit einer charakteristischen Proteinzusammensetzung vollzogen werden (Fatica et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Bassler et al., 2001; Saveanu et al., 2001). Somit scheint es plausibel, dass zwei Proteine, wie Pes1 und NST, die an unterschiedlichen rRNA-Prozessierungsschritten beteiligt sind, in unterschiedlichen prä-RNPs residieren und somit nicht

interagieren. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch unveröffentlichte Massenspektrometrie-Daten von assoziierten Faktoren des PeBoW-Komplexes, welche keine Interaktion von Pes1 mit dem NST-Protein anzeigen (Rohrmoser und Kellner, unveröffentlichte Daten). Eine auf Immunpräzipitationen und Massenspektrometrie basierte Analyse des humanen Interaktoms, welche ebenfalls NST-Interaktionspartner identifizierte, zeigt ebenfalls keinen Pes1-NST Proteinkomplex an (Ewing et al., 2007). Diese Erkenntnisse belegen, dass Pes1 und NST sowohl funktionell als auch physikalisch nicht interagieren.

Die Überexpression von Pes1 hat keinen Einfluss auf die Prozessierung der ribosomalen RNA (Grimm et al., 2006). Für NST konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression des Proteins eine Prozessierung der 32S rRNA-Form beschleunigt (Romanova et al., 2009). Dieses publizierte Ergebnis liefert eine mögliche Erklärung für die beobachtete, erhöhte Proliferationsrate von U2OS-Zellen nach Überexpression von NST. Dieser Phänotyp konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe in U2OS-Zellen beobachtet werden (Zhu et al., 2006). Da eine reibungslose Ribosomenbiogenese eine wesentliche Grundvoraussetzung für die Proliferation von Zellen ist, scheint es plausibel, dass eine Effizienzsteigerung dieses Prozesses durch eine verstärkte Expression von geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren wie NST induziert werden kann (Volarevic et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus *knock-down* – und Überexpressions-Experimenten NST als einen rRNA Prozessierungsfaktor identifizieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nukleolus, die NST in einer rRNA-freien nukleolären Substruktur lokalisierten und somit eine Funktion dieses Proteins als rRNA-Prozessierungsfaktor anzweifeln, werden damit in Frage gestellt (Politz et al., 2005).

4.2 Die basische Domäne von NST kann den *nst-knock-down* Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren

In dieser Arbeit wurden *nst*-Mutanten auf ihre Fähigkeit hin überprüft, den *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Prozessierungsebene zu rekonstituieren. Experimentell wurde dies mit einer RNAi basierten *knock-down knock-in* Strategie realisiert. Dabei konnte das Protein der B6-Mutante als

rekonstituierend und somit als minimale Funktionseinheit von NST auf rRNA-Prozessierungsebene identifiziert werden.

Wie spezifisch ist dieser Rekonstitutionseffekt? Kann dieser Rekonstitutionsphänotyp der B6-Mutante auf eine endogene Kompensation des *nst knock-downs* zurückgeführt werden? In den entsprechenden Experimenten wurde immer eine homologe Rekonstitutionskontrolle mitgeführt, die zeigte, dass neben der Mutante B6 nur die Expression des *nst* – Wildtyp-Gens den *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Ebene rekonstituieren kann. Eine entsprechende heterologe Rekonstitutionskontrolle verdeutlichte, dass die Expression von *Pes1* nach *nst knock-down* nicht in physiologischen 28S-rRNA-Mengen, wie in der Luziferase-Kontrollsituation, resultiert. Somit ist der *nst knock-down* inklusive seiner Rekonstitution als spezifisch einzustufen und zeigt die Abwesenheit von sog. siRNA *Off-target*-Effekten an. Ein denkbarer Kompensationsmechanismus, welcher die Ursache für einen unspezifischen Rekonstitutionsphänotyp sein könnte, ist die verstärkte Expression des endogenen NST-Proteins nach Überexpression der Mutante B6. Solch eine positive Rückkoppelungsschleife hinsichtlich der NST-Expression könnte den beobachtbaren Rekonstitutionsphänotyp der Mutante B6 erklären und würde somit nur einen indirekten Rekonstitutionseffekt der Mutante darstellen. Dies ist aber nicht der Fall, wie aus den entsprechenden Western-Blots abzulesen ist. Das endogene NST-Protein bleibt trotz Überexpression aller Mutanten herabreguliert und ist fast nicht detektierbar. Somit ist anzunehmen, dass das Protein der Mutante B6 tatsächlich den *nst knock-down* Phänotyp spezifisch rekonstituieren kann und dies nicht auf eine erhöhte Wildtyp-Protein Expression zurückzuführen ist.

Aufgrund der Rekonstitutionsphänotypen der Mutanten B5, B6 und B10 lässt sich nun der funktionale Aminosäurebereich des NST-Proteins genau spezifizieren (Abbildung 27). Die Mutanten B5 und B10 können den *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Prozessierungsebene nicht rekonstituieren, im Gegensatz zum B6-Protein. Daraus lässt sich schließen, dass die basische Domäne (AS 1-47) möglicherweise in Kooperation mit der *Coiled Coil* - Domäne (AS 46-110), für diese Fähigkeit verantwortlich ist. Die ersten 12 Aminosäuren der basischen Domäne sind dabei für eine erfolgreiche Rekonstitution essenziell (siehe Mutante B10). Eine Mutante, in der nur die *Coiled Coil* –Domäne deletiert wurde, liegt leider nicht vor. Sie würde in einem *knock-down knock-in* Assay

zusätzlich die Frage nach einer notwendigen Kooperation zwischen basischer und *Coiled Coil* – Domäne für eine Rekonstitution beantworten. Dabei lässt sich über ein Tertiärstruktur-Szenario spekulieren, in dem die *Coiled Coil* - Domäne die Ausbildung einer, für die Rekonstitution notwendigen 3D-Struktur der basischen Domäne unterstützt.

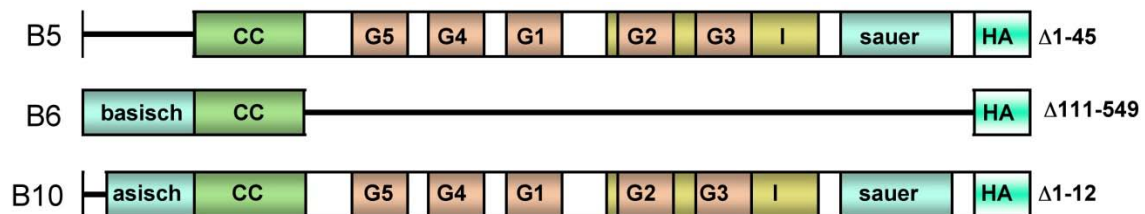


Abbildung 27 Die Mutanten B5, B6 und B10 erlauben eine Kartierung des funktionell essenziellen Aminosäurebereichs des NST-N-Terminus.

Die basische Domäne in den Mutanten B5 und B10 wurde entweder komplett (Mutante B5) oder teilweise (Mutante B10) deletiert. Das Protein der Mutante B6 besteht nur aus der basischen und der *Coiled Coil* Domäne. Die basische Domäne im NST-Protein umfasst 47 Aminosäuren.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden ebenfalls Domänen-abhängige Funktionen des NST-Homologs NUG1 mit Hilfe von Mutanten identifiziert (Bassler et al., 2006). So ist der isolierte N-Terminus von NUG1 (AS 1-154) für eine Vermittlung der nukleolären Lokalisation des Proteins verantwortlich. Diese Domäne ist auch in der Lage, an 60S prä-RNPs zu binden, während eine vollständige bzw. teilweise Deletion (Δ 1-154; Δ 1-37) des N-Terminus diese Assoziation verhindert. Dies zeigt, dass der N-Terminus von NUG1 notwendig und ausreichend für eine prä-RNP Assoziation ist. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der N-Termini von NUG1 und NST ist es somit durchaus denkbar, dass die Rekonstitutionsfähigkeit der B6-Mutante auf ihrer Assoziationsfähigkeit mit prä-RNPs basiert. Diese Interaktion des NST-N-Terminus mit einem prä-RNP kann ausreichend für eine Progression in der rRNA-Prozessierungssequenz sein, so dass schließlich 32S rRNA in reife 28S rRNA prozessiert werden kann.

Kann die B6-Mutante den *nst knock-down* Phänotyp nur auf rRNA-Ebene rekonstituieren? Die Expression des NST-N-Terminus rekonstituiert zwar rRNA-Prozessierung nach *nst knock-down*, kann jedoch den p53 unabhängigen

Proliferationsdefekt nicht kompensieren (nicht gezeigte Daten). Entsprechende Zellen sterben zwar nicht ab, teilen sich aber auch nicht mehr. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der NST N-Terminus zwar Domänen enthält, die ihre Funktion in dem Prozess der rRNA-Prozessierung erfüllen, jedoch nicht die Motive beinhaltet, die für eine weitere Funktion von NST in der Proliferationskontrolle notwendig sind. Diese Proteindomänen könnten somit im mittleren und C-terminalen Abschnitt enthalten sein. Grundsätzlich kann aber mit einer *knock-down knock-in* Strategie die Rekonstitutionsfähigkeit eines rRNA-Prozessierungsfaktors auf Proliferationsebene dargestellt werden. So konnte z.B. für das WDR12- Wildtyp-Protein gezeigt werden, dass seine Expression nach *wdr12 knock-down* sowohl rRNA-Prozessierung als auch auf Proliferation rekonstituieren kann (Holzel et al., 2007).

Warum kann das B6-Protein den *nst knock-down* Phänotyp rekonstituieren? Eine mögliche Antwort auf diese Frage liefert die Ko-Sedimentationsanalyse des B5-, B6- und Wildtyp-Proteins mit prä-ribosomalen Partikeln. Das B6-Protein zeigt ein Ko-Sedimentationsverhalten mit 60S (prä-) RNPs, welches dem NST Wildtyp-Protein sehr ähnlich ist. Das B5-Protein hingegen ist nur in den frühen, oberen Fraktionen des Gradienten detektierbar und zeigt somit ein geringeres Ko-Sedimentationsverhalten mit prä-RNPs. Speziell in den ersten beiden Gradientenfraktionen, in denen hauptsächlich freie, nicht komplexierte Proteine vorliegen, ist das B5-Protein angereichert. Somit scheint es plausibel, dass das B6-Protein aufgrund seiner ausgeprägteren prä-RNP Assoziation eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt, den NST vermittelten rRNA-Prozessierungsschritt in Präribosomen zu induzieren. Über das NST-Hefe-Homolog NUG1 ist bekannt, dass dieses Protein erst in einem sehr späten Stadium der rRNA-Reifung mit prä-RNPs assoziiert (27SB und 26S rRNA-Zwischenform; Fatica und Tollervey, 2002; Krogan et al., 2006). Dies deutet an, dass die letzten, unteren, prä-RNPs enthaltenen Fraktionen des Sucrose-Gradienten eine kritische Rolle im Hinblick auf die NUG1-/NST – prä-RNP-Assoziation spielen und unterstreicht die Bedeutung des Ko-Sedimentationsunterschiedes des B5- und B6-Proteins mit präribosomalen Partikeln.

Warum können die anderen *nst*-Mutanten den rRNA *knock-down* Phänotyp nicht rekonstituieren? Neben dem Verlust der dafür entscheidenden Domäne(n) durch Deletion spielt auch die intrazelluläre Lokalisation der Proteine eine wichtige

Rolle. Ein entsprechendes Protein kann einen *knock-down* Phänotyp wahrscheinlich nur dann rekonstituieren, wenn es in dem zellulären Kompartiment lokalisiert, in dem auch das endogene Wildtyp-Protein vorzufinden ist. Die Hälfte aller *nst*-Mutanten kodiert Proteine, die nicht im Nukleolus lokalisieren (siehe Mutante B4, B5, B7, B8 und B9). Somit ist es unwahrscheinlich, dass diese Genprodukte an einem nukleolären rRNA-Reifungsprozess partizipieren können. Die Proteine der Mutanten B2, B3, B6, B10, B3-7, B3-8 und B3-9 sind zwar aufgrund ihrer nukleolären Lokalisation für eine Rekonstitution des *knock-down* Phänotyps prädestiniert, jedoch können neben der Lokalisation noch weitere Faktoren entscheidend sein, welche die Fähigkeit zur Rekonstitution beeinflussen.

Ein kritischer Parameter ist dabei die Tertiärstruktur (3D-Struktur) der entsprechenden Proteine. Insertionen, Deletionen und auch Punktmutationen können, abhängig von ihrer Lage innerhalb der Primärstruktur, die 3D-Struktur eines Proteins erheblich verändern (Saraste et al., 1990). Gerade die *nst*-Mutanten B7, B8, B9, B3-7, B3-8 und B3-9 tragen Punktmutationen in Domänen/Motiven, die in GTP-bindenden Proteinen Konformationsänderungen ermöglichen und diese als molekulare Schalter agieren lassen (Switch 1- und Switch 2-Regionen, P-Schleife; Sprang et al., 2000; Bourne et al., 1990). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Proteine der Mutanten eine Wildtyp-ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Daraus ergeben sich mehrere funktionelle Implikationen für diese Proteine. Unter der Annahme, dass NST direkt, d.h. ähnlich eines katalytisch aktiven Enzyms an einem rRNA-Prozessierungsschritt partizipiert, kann eine Veränderung der Tertiärstruktur die Konformation des aktiven Zentrums derart stören, dass letzteres nicht mehr funktionell ist. Ist NST indirekt an der rRNA-Reifung beteiligt, z.B. als akzessorischer Faktor in einem Proteinkomplex, so ist in Frage zu stellen, inwieweit die Proteine der Mutanten überhaupt noch in funktionelle Proteinkomplexe eingebaut werden können. Die Veränderung der Tertiärstruktur bedingt oft auch eine Veränderung der Quartärstruktur von Proteinen (Stryer et al., Biochemie 6.Auflage). So konnte z.B. für das Pes1 Protein gezeigt werden, dass eine Deletion der BRCT-Domäne eine Ko-Immunpräzipitation mit dem BOP1- und WDR12-Protein verhindert (Grimm et al., 2006). Auch hat diese Deletion eine geringere Pes1-Proteinstabilität zur Folge, was wohl hauptsächlich auf den fehlenden Einbau

des entsprechenden Proteins in den PeBoW-Komplex zurückzuführen ist (Holzel et al., 2007a; Rohrmoser et al., 2007). Die Quartärstruktur und die Proteinstabilität sind somit weitere Parameter, welche die Rekonstitutionsfähigkeit einer Mutante beeinflussen können.

Schließlich können Primärstrukturveränderungen Auswirkungen auf die post-translationale Regulation eines Proteins haben. Funktionell wichtige Modifikationsstellen des Proteins, wie z.B. eine aktivierende/reprimierende Phosphorylierungsstelle oder eine Ubiquitinierungs-/Sumoylierungssequenz benötigen eine distinkte Protein-Tertiärstruktur, die ihre Oberflächenexponiertheit und Zugänglichkeit für entsprechende Enzyme garantiert. Eine veränderte Tertiärstruktur aufgrund von Deletion, Insertion oder Punktmutation in der DNA-Sequenz könnte einen proteasomalen Abbau des Proteins oder eine deregulierte Funktion zur Folge haben, was eine Rekonstitution des *knock-down* Phänotyps verhindert.

Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass neben dem Verlust entscheidender Domänen und Funktionen auch die Lokalisation und die 3D-Struktur der Proteine der *nst*-Mutanten kritisch für die Rekonstitutionsfähigkeit letzterer sind. Dies trifft auch auf die B6-Mutante zu. Allerdings lässt sich aus der nukleolären Lokalisation und der Rekonstitutionsfähigkeit dieser Mutante schließen, dass diese Tertiärstruktur-abhängigen Eigenschaften des Proteins durch die Deletion des restlichen Proteinabschnitts nicht negativ beeinflusst werden. Somit scheint der mittlere und C-terminale NST-Proteinabschnitt für die Funktion des B6-Proteins in der rRNA-Prozessierung entbehrlich zu sein. Allerdings impliziert der hohe evolutionäre Konservierungsgrad dieser NST-Proteinabschnitte, dass letztere für weitere Funktionen von NST gebraucht werden.

Um die Rekonstitutionsfähigkeit der Mutanten unabhängig von ihrer Lokalisation zu untersuchen, bieten sich zwei spezielle, molekularbiologische Techniken an: nukleoplasmatisch lokalisierende Proteine der Mutanten können durch Fusion mit einer nukleolären Retentionsdomäne in den Nukleolus retranslokiert werden (Meng et al., 2007; Hahn et al., 2007; Kakuk et al., 2008). Somit relokalisieren diese Proteine wieder in dem rRNA-Prozessierungskompartiment und sind potenziell in der Lage rRNA-Reifung zu rekonstituieren.

Um eventuell auftretende Tertiärstrukturstörungen der Proteine der Mutanten,

verursacht durch Deletionen oder Punktmutationen zu unterbinden, kann anstatt einer Mutationsstrategie eine Peptid-basierte Blockierungsstrategie einzelner Oberflächendomänen angewendet werden (Liu et al., 2004; Dissertation von Almad Altaf Dar, 2004). Dazu müssen zuerst einzelne NST-Domänen-spezifische Blockierungspeptide in einer synthetischen Peptid-Bibliothek identifiziert werden. Die DNA, welche diese Blockierungspeptide kodiert, wird dann in Zellen transduziert, welche nach dem *knock-down knock-in* Prinzip behandelt worden sind. Diejenigen Zellen, welche trotz Expression des NST-Wildtypproteins keinen Rekonstitutionsphänotyp mehr aufweisen, enthalten Blockierungspeptide welche funktionell wichtige NST-Domänen blockieren. Natürlich ist auch ein direkter Nachweis der NST-Peptid-Bindung durch z.B. Ko-immunpräzipitation oder native Gelelektrophorese notwendig. Diese Technik bietet des Weiteren den Vorteil, dass sie sich ausschließlich auf potenziell funktionelle Domänen fokussiert, da nur Interaktion vermittelnde Oberflächenstrukturen und keine maskierten Proteinkern-domänen blockiert werden.

4.3 Die Herabregulation von NST induziert die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53

NST verhält sich in Bezug auf das Tumorsuppressorprotein p53 wie ein typischer rRNA-Prozessierungsfaktor, ähnlich wie z.B. BOP1, Pes1 oder WDR12. Der *knock-down* von *nst* induziert einen rRNA-Prozessierungsdefekt, welcher dann in einem p53 vermittelten G1/S-Phase Zellzyklusarrest resultiert (Pestov et al., 2001; Holzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Für die Stabilisierung von p53 nach ribosomalen Stress existieren zwei Modelle in der Literatur, wobei weiterhin unklar ist, inwieweit und in welchem Ausmaß diese tatsächlich *in vivo* zu einer p53-Induktion beitragen. Das nukleoläre Exportmodell von p53 basiert auf der Beobachtung, dass p53 mit der 5,8S rRNA interagiert und mit einer Subpopulation von Ribosomen assoziiert ist (Fontoura et al., 1992, 1997). Es besagt, dass nukleäre p53-Hdm-2 Komplexe auf ihrem Weg ins Zytoplasma zwingend eine intakte Nukleolus-Struktur passieren müssen. Nur wenn dies möglich ist, wird p53 durch Hdm-2 im Zytoplasma ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (Tao und Levine, 1999; Sherr und Weber, 2000). Das

zweite p53-Regulationsmodell beschreibt, wie mehrere nukleoläre Faktoren p53 nach nukleolärem Stress entweder indirekt, durch Sequestrierung von Hdm-2, oder direkt, durch eine unmittelbare Interaktion stabilisieren (Lindström et al., 2007). Hdm-2 Sequestrierungsfaktoren sind z.B. p14ARF, Nucleophosmin und die ribosomalen Proteine S7, L5, L11 und L23 (Weber et al., 1999, 2000; David-Pfeuty und Nouvian-Dooghe, 2002; Colombo et al., 2002; Kurki et al., 2004; Liu et al., 2007; Marechal et al., 1994; Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003; Jin et al., 2004;). Nucleolin hingegen stabilisiert p53 nach einer stressbedingten Auflösung der Nukleolusstruktur durch eine unmittelbare Interaktion (Daniely und Borowiec, 2000).

Ist NST nun ein direkter oder ein indirekter p53-Regulator? Wie in *knock-down* Experimenten mit isogenen, p53-positiven und -negativen Zelllinien nachgewiesen wurde, verlangsamt ein *nst knock-down* die Zellproliferation deutlich. Dieser Effekt ist somit unabhängig vom p53 Status der Zellen. Im Gegensatz dazu ist der nach *nst knock-down* auftretende G1/S-Zellzyklusarrest offensichtlich von p53 abhängig. Allerdings berichteten Meng et al., (2008), dass eine temporäre Depletion von NST in einen G2/M-, anstatt in einem G1/S-Zellzyklusarrest resultiert. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten mit dem unterschiedlichen, genetischen Kontext der Experimente erklären. Die meisten der existierenden Zelllinien weisen erhebliche Unterschiede in ihrer chromosomalen und genetischen Stabilität auf und können sich somit auch in ihren p53 abhängigen Zellzyklus-Antworten auf ribosomalem Stress wie z.B. *knock-down* eines rRNA-Prozessierungsfaktors unterscheiden (Hay et al., 1996). Die Aufteilung des NST-Funktionsspektrums in p53-abhängige und p53-unabhängige Funktionen wird an einem anderen Beispiel deutlich. Die Überexpression von NST resultiert in einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate von p53 positiven U2OS-Zellen. Diese Beobachtung lässt sich unter Einbeziehung bereits veröffentlichter Literatur auf zwei Effekte zurückführen. Zum einen führt eine gesteigerte NST-Proteinmenge zu einer beschleunigten Prozessierung der 32S rRNA in 28S rRNA (Zhu et al., 2006; Romanova et al., 2009). Dies wiederum resultiert in einer erhöhten Ribosomenzahl, welche einen kritischen Parameter während der Zellzyklusprogression darstellt (Montagne et al., 2000). Zum anderen stabilisiert überexprimiertes NST die E3-Ligase Hdm-2 durch eine direkte Interaktion, was

in einer erhöhten Ubiquitinierung und folglich im vermehrten, proteasomalen Abbau von p53 resultiert (Meng et al., 2008). Diese Erniedrigung der p53-Proteinmenge erlaubt ein schnelleres Fortschreiten der Zellen in p53-kontrollierten Zellzykluskontrollpunkten wie G1/S- oder G2/M-Restriktionspunkten. Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass NST sowohl ein 32S-rRNA-Prozessierungsfaktor-, als auch ein indirekter p53 Regulator via funktioneller Aktivierung von Hdm-2 ist. Welche Auswirkungen die von Tsai und McKay publizierte, direkte NST-p53-Interaktion hat, ist weiterhin unklar.

Aber welche zelluläre Antwort nach *nst knock-down* erfolgt zeitlich zuerst? Der 32S-rRNA-Prozessierungsdefekt oder die Herabregulation von Hdm-2? Um diese Frage zu beantworten, ist eine chronologische Erfassung des Auftretens der entsprechenden Phänotypen notwendig. RNA-Lysate von *nst knock-down* Zellen wurden sowohl in den eigenen Experimenten, als auch in den korrespondierenden Publikationen 96h nach Beginn der ersten siRNA-Transfektion hergestellt (Romanova et al., 2009). Die Herabregulation von Hdm-2 nach *nst knock-down* konnte jedoch in Proteinlysaten nachgewiesen werden, die 24h nach der Transfektion eines *nst knock-down* Vektors präpariert worden sind. Somit ist anzunehmen, dass die Hdm-2-p53 Regulation via NST eine frühe Funktion dieses nukleolären Proteins darstellt und die Funktion als rRNA-Prozessierungsfaktor zeitlich später ausgeübt wird.

Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Regulation von p53 und rRNA-Prozessierung? Grundsätzlich kann stabilisiertes p53 mit rRNA-Prozessierung dadurch interferieren, indem es eine RNA-Polymerase-I-vermittelte Transkription der rDNA-Gene reprimiert (Zhai und Comai, 2000). Diese Repression basiert auf einer, durch p53 verhinderten Ausbildung eines Proteinkomplexes von UBF (*upstream binding factor*) mit dem SL1-Komplex (*selectivity factor 1 complex*). Dieser Proteinkomplex ist für eine transkriptionelle Initiation der RNA-Polymerase-I zwingend erforderlich und stellt eine Schnittstelle von rRNA-Transkription und p53 dar. Weitere Erkenntnisse über die Fähigkeit von p53 mit rRNA-Prozessierung zu interferieren, lieferten Experimente mit dem kleinen, biologisch aktiven Molekül Nutlin 3A (Huang et al., 2009; siehe auch Appendix). Nutlin 3A bindet spezifisch an die für p53-Bindung essenzielle Proteinoberflächendomäne von Hdm-2 und inhibiert somit eine Ubiquitinierung

und den daraus resultierenden proteasomalen Abbau des Tumorsuppressorproteins (Vassilev et al., 2004; Huang et al., 2009). Ein weiterer Effekt einer Nutlin 3A-Behandlung von Zellen ist eine spezifische Stabilisierung von NST (Huang et al., 2009). Stabilisiertes NST induziert eine Beschleunigung der 32S rRNA-Prozessierung (Zhu et al., 2006; Romanova et al., 2009). In einem entsprechenden rRNA-Profil von Nutlin 3A behandelten Zellen ist jedoch das Gegenteil beobachtbar (siehe Appendix). Die Prozessierung der 32S-rRNA ist gestört oder zumindest verlangsamt. Daraus lässt sich schließen, dass stabilisiertes NST in Anwesenheit von induziertem p53 die Effizienz der 32S-rRNA-Prozessierung nicht steigern kann. Des Weiteren lässt sich folgern, dass eine p53-Stabilisierung weitere, bisher unbekannte, inhibitorische Effekte auf rRNA-Prozessierung induziert.

Wie lässt sich die beobachtete Rekonstitutionsfähigkeit des B6-Proteins mit der Hdm-2 vermittelten Regulation von NST und p53 verbinden? Das B6-Protein ist in der Lage via seiner N-terminalen, basischen Domäne mit dem p53-Protein zu interagieren (Tsai und McKay, 2002). Welche Bedeutung diese direkte Interaktion der beiden Proteine hat, ist weiterhin unklar und stellt eine interessante Fragestellung für zukünftige Forschungsprojekte dar. Bezüglich einer Interaktion des B6-Proteins mit Hdm-2 lässt sich vermuten, dass aufgrund der Abwesenheit der C-terminalen sauren Domäne im B6-Protein keine Hdm-2 Bindung möglich ist (Meng et al., 2008). Daraus folgt, dass das B6-Protein zwar eindeutig in der Lage ist, einen *nst knock-down* Phänotyp auf rRNA-Prozessierungsebene zu rekonstituieren, jedoch aufgrund einer fehlenden Hdm-2 Interaktionsdomäne eine mögliche p53-Regulatorfunktion von Wildtyp-NST nicht substituieren kann.

4.4 Die nukleoläre Lokalisation von NST wird durch eine Kooperation von basischer Domäne und GTP-bindender Motive vermittelt

Während der Entstehung dieser vorliegenden Arbeit veröffentlichten Tsai und McKay den Lokalisationsphänotyp von Proteinen ähnlicher *nst* Mutanten (Mutante B2, B3, B5, B7, B8). Diese Veröffentlichung enthielt auch drei Doppelmutanten, die trotz Punktmutationen in den GTP-bindenden Motiven und einer Deletion der I-Domäne für Proteine kodierten, welche im Nukleolus

lokalisierten (siehe Mutanten B3-7, B3-8 und B3-9; Tsai und McKay, 2005). Aus der Kombination eigener und dieser, bereits publizierten Ergebnisse lässt sich nun folgendes Domänen-abhängiges Lokalisationsmodell von NST ableiten:

Nukleoläre Retention

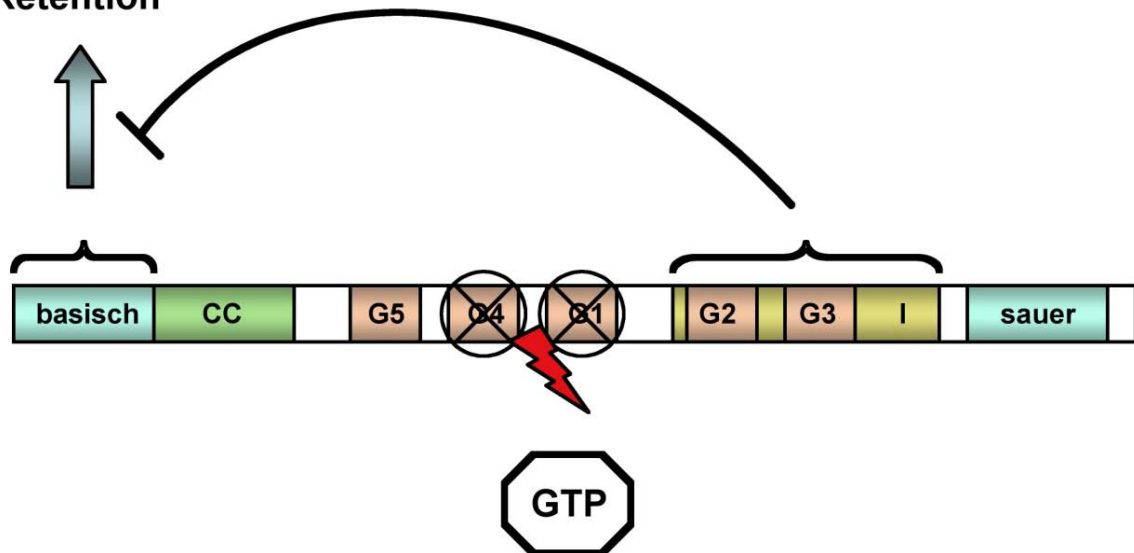


Abbildung 28 Die I-Domäne verhindert eine nukleoläre Lokalisation des NST Proteins im GTP ungebundenen Zustand.

Nukleoläre Retention wird ausschließlich durch die N-terminal gelegene, basische Domäne von NST vermittelt, falls ein GTP-Molekül an das Protein gebunden ist (Tsai und McKay, 2005). Wird eine GTP-Bindung aufgrund von Punktmutationen in dem G4- und G1-Motiv (durchgestrichene Kreise) verhindert (rotes Blitzsymbol), so inhibiert die I-Domäne eine Vermittlung der nukleolären Retention. Es ist anzunehmen, dass dies durch eine intramolekulare Maskierung der basischen Domäne geschieht.

Punktmutationen in den GTP-bindenden Motiven G1 und G4 oder die Deletion der N-terminalen, basischen Domäne resultieren in einer nukleoplasmatischen Lokalisation von NST (siehe B5-, B7-, B8- und B9-Protein). Die basische Domäne allein und im Verbund mit der *Coiled Coil* Domäne ist in der Lage, im Nukleolus zu residieren (siehe B6-Protein, Tsai und McKay, 2005). Eine Deletion der I-Domäne und der darin enthaltenen G2- und G3-Motive rekonstituieren eine nukleoläre Lokalisation in Anwesenheit von Punktmutationen in dem G1- und G4-GTP-Bindungsmotiv (siehe B3-7-, B3-8-, und B3-9-Protein). Daraus lässt sich schließen, dass für eine nukleoläre Lokalisation die basische Domäne und intakte G1- und G4-GTP-Bindungsmotive zwingend erforderlich sind.

Eine nukleoläre Lokalisation von NST im GTP ungebundenen Zustand könnte somit durch die I-Domäne, respektive durch die G2- und G3-GTP-Bindungsdomänen verhindert werden. Wahrscheinlich besitzt die basische Domäne eine nukleoläre Retentionseigenschaft, welche in Abwesenheit eines gebundenen GTP-Moleküls durch eine I-Domänen abhängige intramolekulare Maskierung inhibiert wird. Bleibt zu erwähnen, dass eine tatsächliche Bindung von GTP an das NST-Protein mittels *in vitro* durchgeführten GTP-Agarose-Retentionsexperimenten bestätigt werden konnte (Tsai und McKay, 2005).

4.5 Ausblick

Die Identifizierung des NST-N-Terminus als minimale Funktionseinheit basiert auf dem Rekonstitutionsphänotyp einer *nst*-Mutante. Mutationsanalysen haben generell den experimentellen Nachteil, dass durch Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen die Tertiärstruktur des Proteins gestört werden kann. Die dabei entstehenden Proteine der Mutanten haben meistens mit dem Wildtyp-Protein nichts mehr gemein und stellen somit eher eine artifizielle bzw. eine *de novo* Proteinvariante des *nst*-Gens dar. Dieses experimentelle Manko kann durch Verwendung einer Peptid-basierten Blockierungsstrategie einzelner Oberflächendomänen *in vivo* umgangen werden (Liu et al., 2004; Dissertation von Almad Altaf Dar, 2004). Die native Protein-3D-Struktur bleibt bei dieser experimentellen Technik erhalten und es kann unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Überexpression einer Mutante, die Rekonstitutionsfähigkeit einzelner Domänen überprüft werden.

Die Tatsache, dass die Expression der B6-Mutante den *knock-down* Phänotyp zwar auf rRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proliferationsebene rekonstituieren kann, deutet darauf hin, dass NST weitere, unbekannte Funktionen in der Zelle erfüllt. Für diese Funktionen scheint der mittlere- und C-terminale Proteinabschnitt von Nöten. Zur Erhellung des NST-Funktionsspektrums wäre eine Charakterisierung der NST Interaktionspartner via Massenspektrometrie hilfreich. Nach Bestätigung der somit identifizierten Interaktionen in entsprechenden *vice versa* Immunpräzipitationen, kann untersucht werden, wie NST und seine Interaktionspartner funktional und regulativ voneinander abhängig sind. Dabei sollten notwendige Interaktionsdomänen, eventuell auftretende Subkomplexe und Assemblierungshierarchien identifiziert werden. Eine weitere Technik, die

Hinweise auf NST-abhängige Funktionen geben kann, wäre eine Genchip-Analyse. Welche Gene werden nach NST Überexpression oder *knock-down* differenziell reguliert? An welchen zellulären Signalwegen sind diese differenziell regulierten Gene beteiligt? Mit Hilfe dieser Methode kann auch die kürzlich publizierte, jedoch fragliche Regulation des transformierenden Homoeoboxgens Cdx2 durch NST überprüft werden (Sun et al., 2009).

5 Zusammenfassung

Die Biogenese von Ribosomen ist Voraussetzung für die Neusynthese von Proteinen und somit auch für Zellwachstum unabdingbar. In den Nukleoli der Zellen muss eine Vielzahl von Ribosomenbiogenese-Faktoren funktionell reguliert und koordiniert werden, damit reife 40S- und 60S- ribosomale Untereinheiten entstehen. Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, wie das *nucleostemin* (*nst*) Gen an dem zellulären Prozess der Ribosomenbiogenese partizipiert. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mehrere Punkt- und Deletionsmutanten von *nst* kloniert, exprimiert und zuerst auf ihren intrazellulären Lokalisationsphänotyp hin überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die vorwiegend nukleoläre Lokalisation von NST durch den N-Terminus des Proteins, bestehend aus der basischen- und *Coiled-Coil* Domäne, vermittelt und durch zirkulär permutierte GTP-Bindemotive reguliert wird. Die Überexpression der *nst* Mutanten verursachte des Weiteren keine nukleoplasmatische Translokation des nukleolären Stressdetektorproteins Nucleophosmin (B23). Ein weiterer Überexpressionsphänotyp des *nst* Wildtyp-Gens ist eine signifikante Proliferationserhöhung in p53-positiven Zellen. Ein *knock-down* von *nst* resultiert in einer deutlichen Proliferationsinhibition von p53 positiven- als auch p53 negativen Zellen und einem p53 vermittelten G1/S-Phase Zellzyklusarrest. Auf Ebene der ribosomalen RNA induziert die temporäre Herabregulation von *nst* einen 32S-rRNA-Prozessierungsdefekt, welcher in verringerten *de novo* prozessierten 28S rRNA Mengen resultiert. In einem miRNA/siRNA basierten *knock-down knock-in* Experiment wurde der N-Terminus des Proteins zudem als minimale Funktionseinheit identifiziert: die Expression einer Mutante, bestehend aus der basischen und *Coiled Coil* Domäne, konnte den durch RNAi induzierten 32S-rRNA-Prozessierungsdefekt kompensieren. Der N-Terminus von NST sedimentiert zudem in einem Sucrose-Gradienten in Wildtyp-ähnlicher Manier, im Gegensatz zu einer NST Proteinvariante, welcher dieser Teil des Proteins fehlt. Eine Interaktion des NST-Proteins mit dem PeBoW-Komplex oder dem p53 Regulator Hdm-2 konnte nicht gezeigt werden. Diese Arbeit beschreibt somit NST als 32S rRNA-Prozessierungsfaktor und definiert den N-Terminus des Proteins als minimale Funktionseinheit während der Ribosomenbiogenese.

6 Literaturverzeichnis

Aitchison, J. D., and Rout, M. P. (2000). The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway. *J Cell Biol* 151, F23-26.

Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7, 303-310.

Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C., and Phinney, D. G. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89, 1235-1249.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* 12, 461-468.

Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* 8, 517-529.

Beekman, C., Nichane, M., De Clercq, S., Maetens, M., Floss, T., Wurst, W., Bellefroid, E., and Marine, J. C. (2006). Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development. *Mol Cell Biol* 26, 9291-9301.

Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S., and Baserga, S. J. (2004). The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell* 3, 1619-1626.

Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., *et al.* (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3, 199-204.

Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.

Borovjagin, A. V., and Gerbi, S. A. (2000). The spacing between functional Cis-elements of U3 snoRNA is critical for rRNA processing. *J Mol Biol* 300, 57-74.

Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.

Cada, Z., Boucek, J., Dvorankova, B., Chovanec, M., Plzak, J., Kodets, R., Betka, J., Pinot, G. L., Gabius, H. J., and Smetana, K., Jr. (2007). Nucleostemin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 27, 3279-3284.

Cai, J., Cheng, A., Luo, Y., Lu, C., Mattson, M. P., Rao, M. S., and Furukawa, K. (2004). Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem* 88, 212-226.

Cavaille, J., and Bachellerie, J. P. (1996). Processing of fibrillarin-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie* 78, 443-456.

Cavaille, J., Hadjiolov, A. A., and Bachellerie, J. P. (1996a). Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA. *Eur J Biochem* 242, 206-213.

Cavaille, J., Nicoloso, M., and Bachellerie, J. P. (1996b). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 383, 732-735.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-3265.

Colombo, E., Marine, J. C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P. G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.

Dai, M. S., Sun, X. X., and Lu, H. (2008). Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of MDM2. *Mol Cell Biol* 28, 4365-4376.

Dar, A. (2002). Expression of short peptides in vivo to modulate protein interactions. 1-99.

David-Pfeuty, T., and Nouvian-Dooghe, Y. (2002). Human p14(Arf): an exquisite sensor of morphological changes and of short-lived perturbations in cell cycle and in nucleolar function. *Oncogene* 21, 6779-6790.

David-Pfeuty, T., Nouvian-Dooghe, Y., Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2001). Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 20, 5951-5963.

de Beus, E., Brockenbrough, J. S., Hong, B., and Aris, J. P. (1994). Yeast NOP2 encodes an essential nucleolar protein with homology to a human proliferation marker. *J Cell Biol* 127, 1799-1813.

Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Sirri, V., and Ochs, R. L. (1998). Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152, 1291-1297.

Deshmukh, M., Tsay, Y. F., Paulovich, A. G., and Woolford, J. L., Jr. (1993). Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol* 13, 2835-2845.

Dez, C., Houseley, J., and Tollervey, D. (2006). Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 25, 1534-1546.

Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.

Du, Q., Thonberg, H., Wang, J., Wahlestedt, C., and Liang, Z. (2005). A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res* 33, 1671-1677.

Du, Y. C., and Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* 109, 835-848.

Dunbar, D. A., Dragon, F., Lee, S. J., and Baserga, S. J. (2000). A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13027-13032.

Dundr, M., and Olson, M. O. (1998). Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell* 9, 2407-2422.

Emery, B., de la Cruz, J., Rocak, S., Deloche, O., and Linder, P. (2004). Has1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 52, 141-158.

Epel, E. S., Blackburn, E. H., Lin, J., Dhabhar, F. S., Adler, N. E., Morrow, J. D., and Cawthon, R. M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17312-17315.

Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., *et al.* (2007). Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3, 89.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., *et al.* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352, 254-266.

Fatica, A., Cronshaw, A. D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 9, 341-351.

Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14, 313-318.

Fedorov, Y., King, A., Anderson, E., Karpilow, J., Ilsley, D., Marshall, W., and Khvorova, A. (2005). Different delivery methods-different expression profiles. *Nat Methods* 2, 241.

Fontoura, B. M., Atienza, C. A., Sorokina, E. A., Morimoto, T., and Carroll, R. B. (1997). Cytoplasmic p53 polypeptide is associated with ribosomes. *Mol Cell Biol* 17, 3146-3154.

Fontoura, B. M., Sorokina, E. A., David, E., and Carroll, R. B. (1992). p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Mol Cell Biol* 12, 5145-5151.

Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.

Galani, K., Nissan, T. A., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2004). Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J Biol Chem* 279, 55411-55418.

Gallagher, J. E., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., and Baserga, S. J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* 18, 2506-2517.

Ganot, P., Bortolin, M. L., and Kiss, T. (1997a). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89, 799-809.

Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1997b). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev* 11, 941-956.

Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., *et al.* (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10, 105-115.

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7, 311-318.

Grimm, T., Holzel, M., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., and Liu, E. T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 60, 5922-5928.

Hahn, M. A., and Marsh, D. J. (2007). Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals. *FEBS Lett* 581, 5070-5074.

Han, C., Zhang, X., Xu, W., Wang, W., Qian, H., and Chen, Y. (2005). Cloning of the nucleostemin gene and its function in transforming human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells into F6 tumor cells. *Int J Mol Med* 16, 205-213.

Haque, J., Boger, S., Li, J., and Duncan, S. A. (2000). The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain. *Genomics* 70, 201-210.

Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., *et al.* (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* 8, 505-515.

Hay, R. J. (1996). Human cells and cell cultures: availability, authentication and future prospects. *Hum Cell* 9, 143-152.

Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J. P., Petfalski, E., Kearsey, S., and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *Embo J* 13, 2452-2463.

Holzel, M., Grimm, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Harasim, T., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007a). The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 35, 789-800.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Orban, M., Homig, C., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Heissmeyer, V., Bornkamm, G., and Eick, D. (2007b). Rapid conditional knock-down-knock-in system for mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35, e17.

Holzel, M., Rohmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W., and Eick, D. (2005). Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol* 170, 367-378.

Hong, B., Brockenbrough, J. S., Wu, P., and Aris, J. P. (1997). Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol Cell Biol* 17, 378-388.

Hozak, P., Cook, P. R., Schofer, C., Mosgoller, W., and Wachtler, F. (1994). Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 639-648.

Huang, M., Itahana, K., Zhang, Y., and Mitchell, B. S. (2009). Depletion of guanine nucleotides leads to the Mdm2-dependent proteasomal degradation of nucleostemin. *Cancer Res* 69, 3004-3012.

Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 24, 7669-7680.

Kakuk, A., Friedlander, E., Vereb, G., Jr., Lisboa, D., Bagossi, P., Toth, G., Gergely, P., and Vereb, G. (2008). Nuclear and nucleolar localization signals and their targeting function in phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. *Exp Cell Res* 314, 2376-2388.

Kawashima, M., Kawakita, T., Yoshida, S., Shimmura, S., and Tsubota, K. (2009). Nucleostemin as a possible progenitor marker of corneal epithelial cells. *Mol Vis* 15, 1162-1168.

Kermani, A. J., Fathi, F., and Mowla, S. J. (2008). Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res* 11, 379-386.

Kressler, D., Linder, P., and de La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897-7912.

Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.

Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., *et al.* (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* 13, 225-239.

Kurki, S., Peltonen, K., and Laiho, M. (2004a). Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle* 3, 976-979.

Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M. (2004b). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5, 465-475.

LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724.

Lebreton, A., Rousselle, J. C., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Fromont-Racine, M., and Saveanu, C. (2008). 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res* 36, 4988-4999.

Leonard, B. W., Mastroeni, D., Grover, A., Liu, Q., Yang, K., Gao, M., Wu, J., Pootrakul, D., van den Berge, S. A., Hol, E. M., and Rogers, J. (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* 515, 269-294.

Li, H. D., Zagorski, J., and Fournier, M. J. (1990). Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 1145-1152.

Lindstrom, M. S., Deisenroth, C., and Zhang, Y. (2007a). Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions. *Cell Cycle* 6, 434-437.

Lindstrom, M. S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G., and Zhang, Y. (2007b). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* 27, 1056-1068.

Liu, R. L., Zhang, Z. H., Zhao, W. M., Wang, M., Qi, S. Y., Li, J., Zhang, Y., Li, S. Z., and Xu, Y. (2008). Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. *Chin Med J (Engl)* 121, 299-304.

Liu, S. J., Cai, Z. W., Liu, Y. J., Dong, M. Y., Sun, L. Q., Hu, G. F., Wei, Y. Y., and Lao, W. D. (2004). Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol* 10, 1246-1249.

Liu, S. J., Zhang, Z. H., Zhang, D. Q., Sui, X. M., Liu, Y. J., Cai, Z. W., Yuan, X. Y., Sun, L. Q., Hu, G. F., and Liu, R. L. (2006). Gene profiling after knocking-down expression of nucleostemin in Hela cells using oligonucleotide DNA microarray. *J Exp Clin Cancer Res* 25, 575-583.

Liu, X., Liu, Z., Jang, S. W., Ma, Z., Shinmura, K., Kang, S., Dong, S., Chen, J., Fukasawa, K., and Ye, K. (2007). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9679-9684.

Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577-587.

Ma, H., and Pederson, T. (2008a). Nucleophosmin is a binding partner of nucleostemin in human osteosarcoma cells. *Mol Biol Cell* 19, 2870-2875.

Ma, H., and Pederson, T. (2008b). Nucleostemin: a multiplex regulator of cell-cycle progression. *Trends Cell Biol* 18, 575-579.

Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J. C., and Levine, A. J. (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* 14, 7414-7420.

Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S., and Sedivy, J. M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* 8, 1039-1048.

McClintock, B. (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zellforsch Mikrosk* 21, 294-398.

Mekhail, K., Khacho, M., Carrigan, A., Hache, R. R., Gunaratnam, L., and Lee, S. (2005). Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J Cell Biol* 170, 733-744.

Meng, L., Lin, T., and Tsai, R. Y. (2008). Nucleoplasmic mobilization of nucleostemin stabilizes MDM2 and promotes G2-M progression and cell survival. *J Cell Sci* 121, 4037-4046.

Meng, L., Zhu, Q., and Tsai, R. Y. (2007). Nucleolar trafficking of nucleostemin family proteins: common versus protein-specific mechanisms. *Mol Cell Biol* 27, 8670-8682.

Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6274-6279.

Miles, T. D., Jakovljevic, J., Horsey, E. W., Harnpicharnchai, P., Tang, L., and Woolford, J. L., Jr. (2005). Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes. *Mol Cell Biol* 25, 10419-10432.

Milkereit, P., Gadai, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105, 499-509.

Milkereit, P., Kuhn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res* 31, 799-804.

Misteli, T. (2005). Going in GTP cycles in the nucleolus. *J Cell Biol* 168, 177-178.

Montagne, J. (2000). Genetic and molecular mechanisms of cell size control. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 195-202.

Morrissey, J. P., and Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 13, 2469-2477.

Mougey, E. B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O. L., Jr., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. (1993a). The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* 7, 1609-1619.

Mougey, E. B., Pape, L. K., and Sollner-Webb, B. (1993b). A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 13, 5990-5998.

Nal, B., Mohr, E., Silva, M. I., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B. R., and Ferrier, P. (2002). Wdr12, a mouse gene encoding a novel WD-Repeat Protein with a notchless-like amino-terminal domain. *Genomics* 79, 77-86.

Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J* 21, 5539-5547.

Nomura, J., Maruyama, M., Katano, M., Kato, H., Zhang, J., Masui, S., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Nishimoto, M., and Okuda, A. (2009). Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells* 27, 1066-1076.

O'Connell, B. C., Cheung, A. F., Simkevich, C. P., Tam, W., Ren, X., Mateyak, M. K., and Sedivy, J. M. (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 278, 12563-12573.

Ohmura, M., Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Shugo, H., Tamase, A., Uema, N., Ooshio, T., Arai, F., Takubo, K., *et al.* (2008). Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells* 26, 3237-3246.

Olson, M. O. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004, pe10.

Olson, M. O., Hingorani, K., and Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* 219, 199-266.

Oster, S. K., Ho, C. S., Soucie, E. L., and Penn, L. Z. (2002). The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* 84, 81-154.

Peculis, B. A., and Steitz, J. A. (1993). Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 73, 1233-1245.

Perez-Fernandez, J., Roman, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X. R., and Dosil, M. (2007). The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol Cell Biol* 27, 5414-5429.

Pestov, D. G., Stockelman, M. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001a). ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3621-3630.

Pestov, D. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001b). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 21, 4246-4255.

Politz, J. C., Polena, I., Trask, I., Bazett-Jones, D. P., and Pederson, T. (2005). A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. *Mol Biol Cell* 16, 3401-3410.

Qiao, C., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., Jiang, R., Yan, Y., Mao, F., Yang, H., *et al.* (2008). Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int* 32, 8-15.

Rohrmoser, M., Holzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 27, 3682-3694.

Romanova, L., Grand, A., Zhang, L., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., and Kikyo, N. (2009). Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem* 284, 4968-4977.

Samad, A., and Carroll, R. B. (1991). The tumor suppressor p53 is bound to RNA by a stable covalent linkage. *Mol Cell Biol* 11, 1598-1606.

Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15, 430-434.

Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J* 20, 6475-6484.

Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B., and Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153, 1097-1110.

Schlosser, I., Holzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U. H., and Eick, D. (2005). Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520-524.

Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., and Eick, D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31, 6148-6156.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.

Schwartz, P. H., Bryant, P. J., Fuja, T. J., Su, H., O'Dowd, D. K., and Klassen, H. (2003). Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 74, 838-851.

Schwartz, P. H., Nethercott, H., Kirov, II, Ziaieian, B., Young, M. J., and Klassen, H. (2005). Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. *Stem Cells* 23, 1286-1294.

Siddiqi, S., Gude, N., Hosoda, T., Muraski, J., Rubio, M., Emmanuel, G., Fransioli, J., Vitale, S., Parolin, C., D'Amario, D., *et al.* (2008). Myocardial induction of nucleostemin in response to postnatal growth and pathological challenge. *Circ Res* 103, 89-97.

Sijin, L., Ziwei, C., Yajun, L., Meiyu, D., Hongwei, Z., Guofa, H., Siguo, L., Hong, G., Zhihong, Z., Xiaolei, L., *et al.* (2004). The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the in vitro proliferation and in vivo tumorigenesis of HeLa cells. *J Exp Clin Cancer Res* 23, 529-538.

Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., and Schuster, G. (2006). Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 2966-2975.

Sprang, S. R. (2000). Conformational display: a role for switch polymorphism in the superfamily of regulatory GTPases. *Sci STKE* 2000, PE1.

Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R. J., Hannon, G. J., and Elledge, S. J. (2005). A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13212-13217.

Steitz, J. A., Berg, C., Hendrick, J. P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J., and Yario, T. (1988). A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* 106, 545-556.

Strezoska, Z., Pestov, D. G., and Lau, L. F. (2000). Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S RRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 20, 5516-5528.

Strezoska, Z., Pestov, D. G., and Lau, L. F. (2002). Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J Biol Chem* 277, 29617-29625.

Stryer, L., Berg, J., and Tymoczko, J. (2006). *Biochemistry*, 6th rev.ed edn: Palgrave Macmillan).

Sun, Y. G., Wang, X. W., Yang, S. M., Zhou, G., Wang, W. Q., Wang, H. B., Wang, R. Q., and Fang, D. C. (2009). Inhibition of Nucleostemin Upregulates CDX2 Expression in HT29 Cells in Response to Bile Acid Exposure: Implications in the Pathogenesis of Barrett's Esophagus. *J Gastrointest Surg*.

Swaminathan, S. (2005). Nucleolar targeting runs on GTP cycles. *Nat Cell Biol* 7, 217.

Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E., and Woolford, J. L., Jr. (2008). Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Mol Biol Cell* 19, 2844-2856.

Tomlinson, R. L., Ziegler, T. D., Supakorndej, T., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 955-965.

Tsai, R. Y., and McKay, R. D. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 16, 2991-3003.

Tsai, R. Y., and McKay, R. D. (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168, 179-184.

Tsai, R. Y., and Meng, L. (2009). Nucleostemin: A latecomer with new tricks. *Int J Biochem Cell Biol*.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-263.

Vanacova, S., and Stefl, R. (2007). The exosome and RNA quality control in the nucleus. *EMBO Rep* 8, 651-657.

Vassilev, L. T. (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3, 419-421.

Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.

Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261-311.

Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288, 2045-2047.

Wagner, R. (1835). Einige Bemerkungen und Fragen über das Keimbläschen (vesicula germinativa). *Müller's Archiv AnatPhysiolWissenschaftMed* 3, 373-377.

Warner, J. R. (2001). Nascent ribosomes. *Cell* 107, 133-136.

Watson, J. D., Oster, S. K., Shago, M., Khosravi, F., and Penn, L. Z. (2002). Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J Biol Chem* 277, 36921-36930.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.

Woolfson, D. N. (2005). The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv Protein Chem* 70, 79-112.

Wu, R. S., Kumar, A., and Warner, J. R. (1971). Ribosome formation is blocked by camptothecin, a reversible inhibitor of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 3009-3014.

Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-1132.

Xu, W., Qian, H., Zhu, W., Chen, Y., Shao, Q., Sun, X., Hu, J., Han, C., and Zhang, X. (2004). A novel tumor cell line cloned from mutated human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells. *Oncol Rep* 12, 501-508.

Yamauchi, T., Keough, R. A., Gonda, T. J., and Ishii, S. (2008). Ribosomal stress induces processing of Mybbp1a and its translocation from the nucleolus to the nucleoplasm. *Genes Cells* 13, 27-39.

Yang, H. X., Jin, G. L., Meng, L., Zhang, J. Z., Liu, W. B., and Shou, C. C. (2005). Screening and identification of proteins interacting with nucleostemin. *World J Gastroenterol* 11, 4812-4814.

Ye, F., Zhou, C., Cheng, Q., Shen, J., and Chen, H. (2008). Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 8, 108.

Zanchin, N. I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D. S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 5001-5015.

Zhai, W., and Comai, L. (2000). Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 20, 5930-5938.

Zhang, G. Y., Zhao, G. Q., Yin, L., and Zhang, Q. X. (2008). [Construction and identification of a eukaryotic expression vector for the small interfering RNA targeting nucleostemin gene]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28, 392-395.

Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M. P., Hiley, S. L., Hughes, T., and Woolford, J. L., Jr. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* 21, 2580-2592.

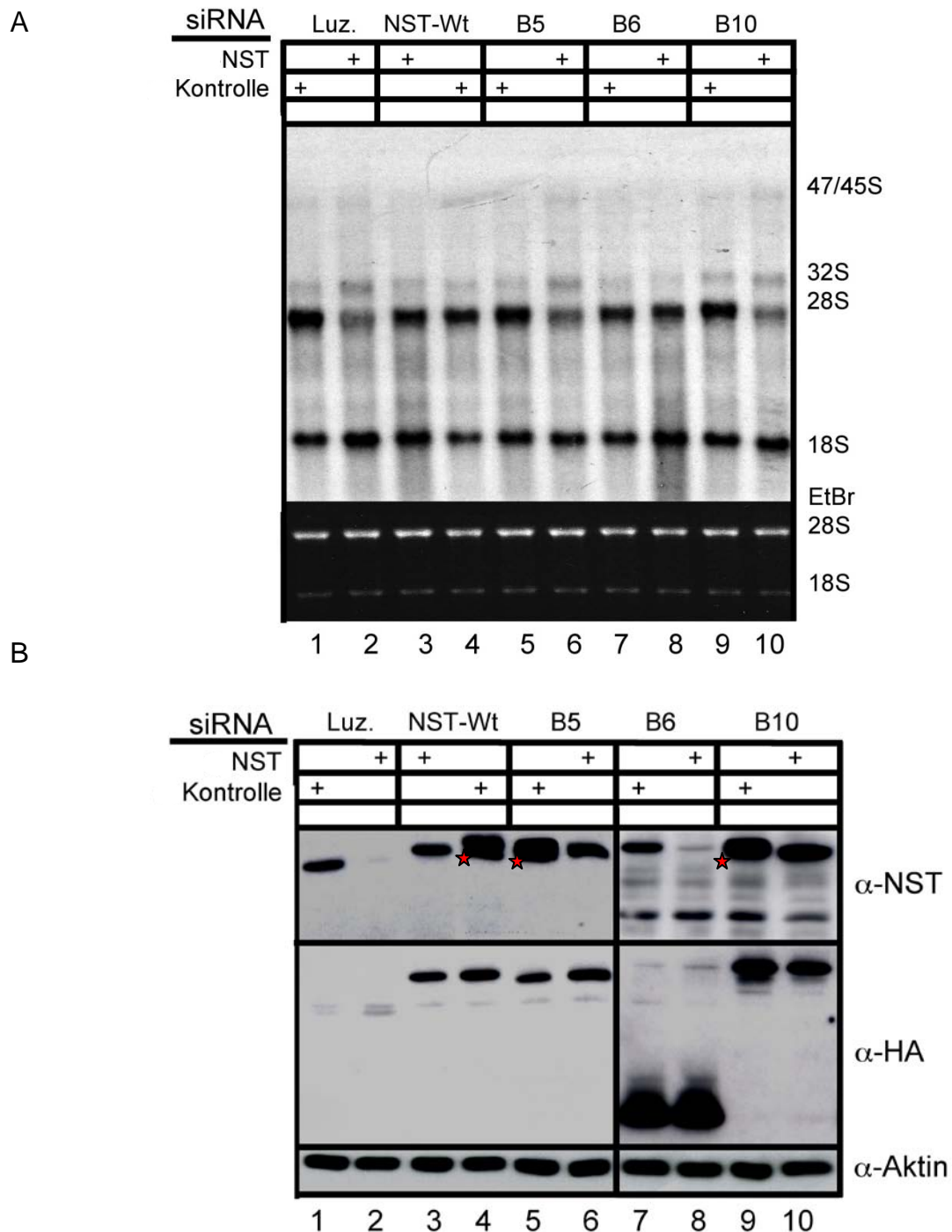
Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902-8912.

Zhu, Q., Meng, L., Hsu, J. K., Lin, T., Teishima, J., and Tsai, R. Y. (2009). GNL3L stabilizes the TRF1 complex and promotes mitotic transition. *J Cell Biol* 185, 827-839.

Zhu, Q., Yasumoto, H., and Tsai, R. Y. (2006). Nucleostemin delays cellular senescence and negatively regulates TRF1 protein stability. *Mol Cell Biol* 26, 9279-9290

7 Appendix

7.1 Reproduktionsexperiment: Die B6-Mutante kann den *nst* knock-down Phänotyp in der rRNA-Prozessierung rekonstituieren



C

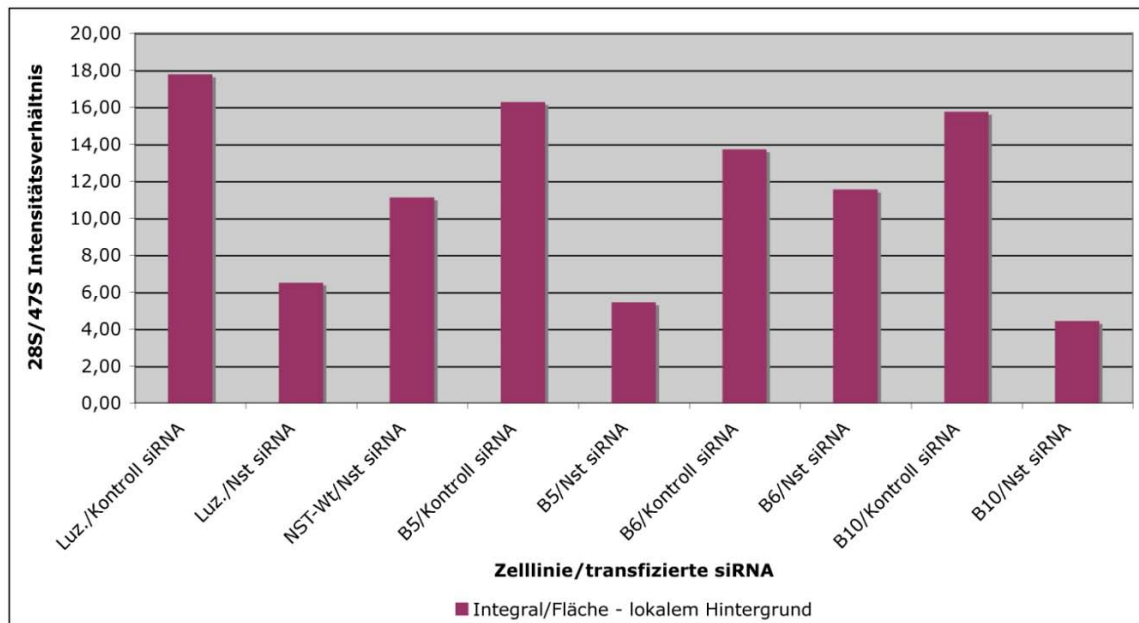
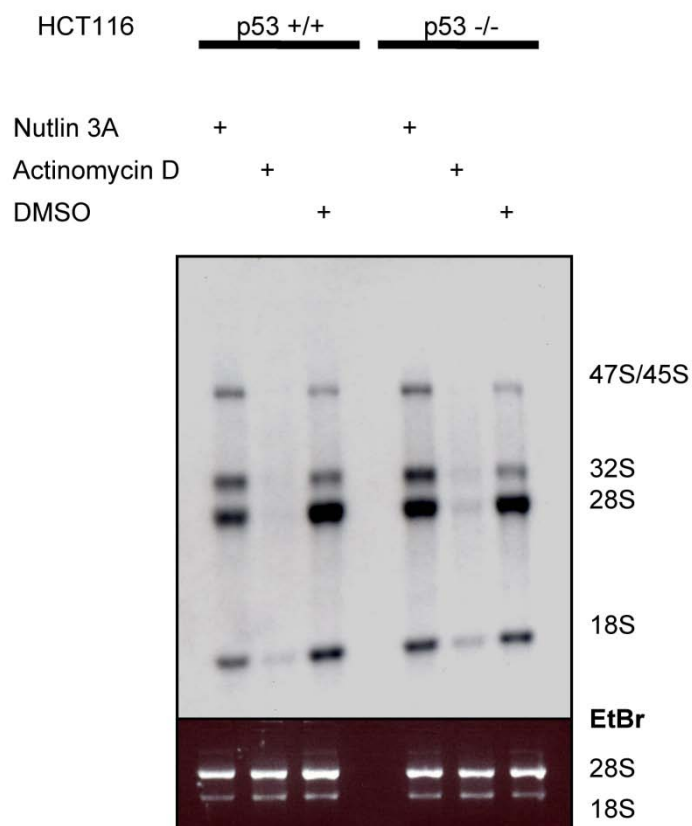


Abbildung 29 Die B6-Mutante kann den 32S Prozessierungsdefekt in einem *knock-down knock-in* Experiment rekonstituieren

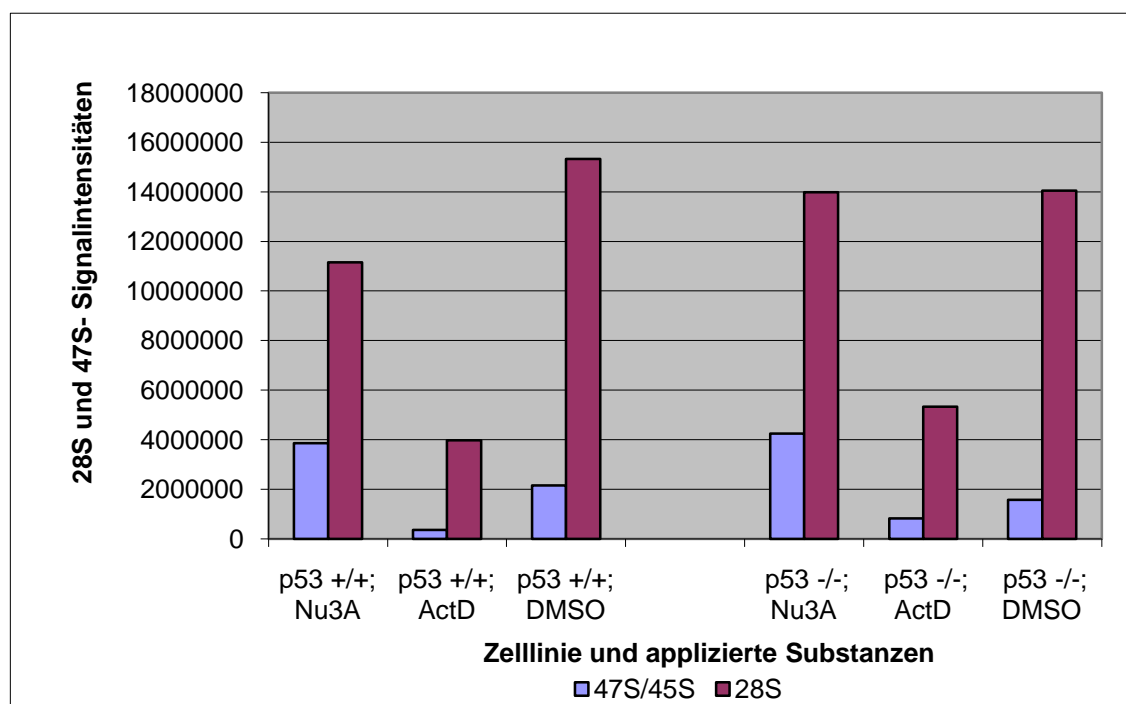
(A) Autoradiographische Detektion von *in vivo* markierter RNA aus U2OS-Zellen, die mit der angegebenen siRNA transfiziert worden sind und die die angegebenen *nst*-Mutanten exprimieren. Die Etidiumbromid-Färbung dient zur Kontrolle der RNA-Beladung in jeder Gelspur. (B) Das *knock-down knock-in* Experiment auf Proteinebene. Die Expression der Mutanten wurde mit Hilfe des NST- und des Hämagglutinin-Antikörpers überprüft. Eine Aktin-Immundetektion diente als Ladungskontrolle für jede Gelspur. Rote Sternchen identifizieren Doppelbanden, die gelelektrophoretisch nicht aufgelöst worden sind. (C) Quantifizierung der autoradiographischen Signale aus (A) mit Hilfe eines *Phosphoimagers*. Die Signalintensitäten der 28S und 47S/45S rRNA Banden wurden unter Verwendung einer Integralmessmethode quantifiziert. Lokale Hintergrundsignale wurden von den Messwerten subtrahiert.

7.2 Effekt von Nutlin 3A auf rRNA-Prozessierung

A



B



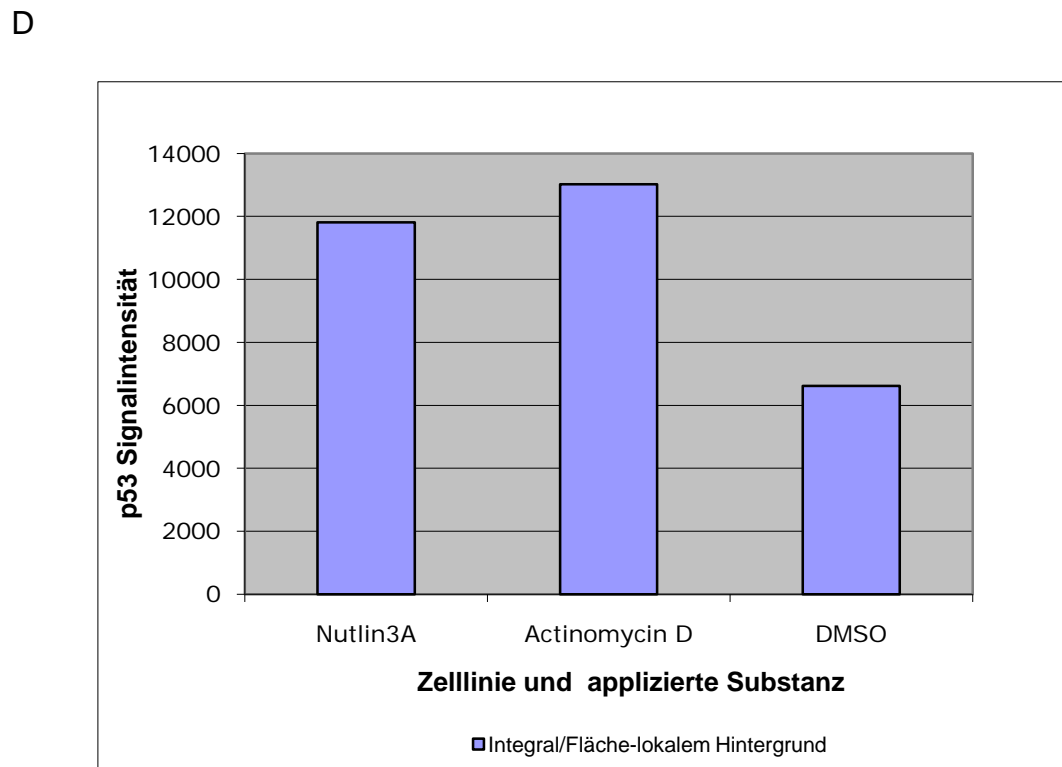
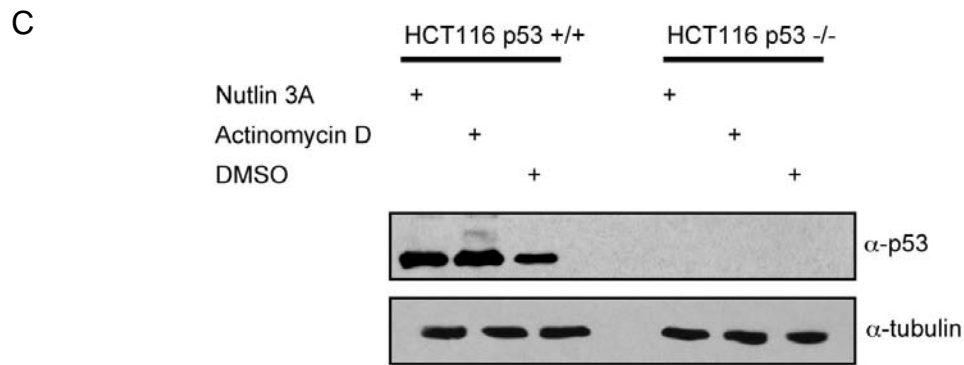
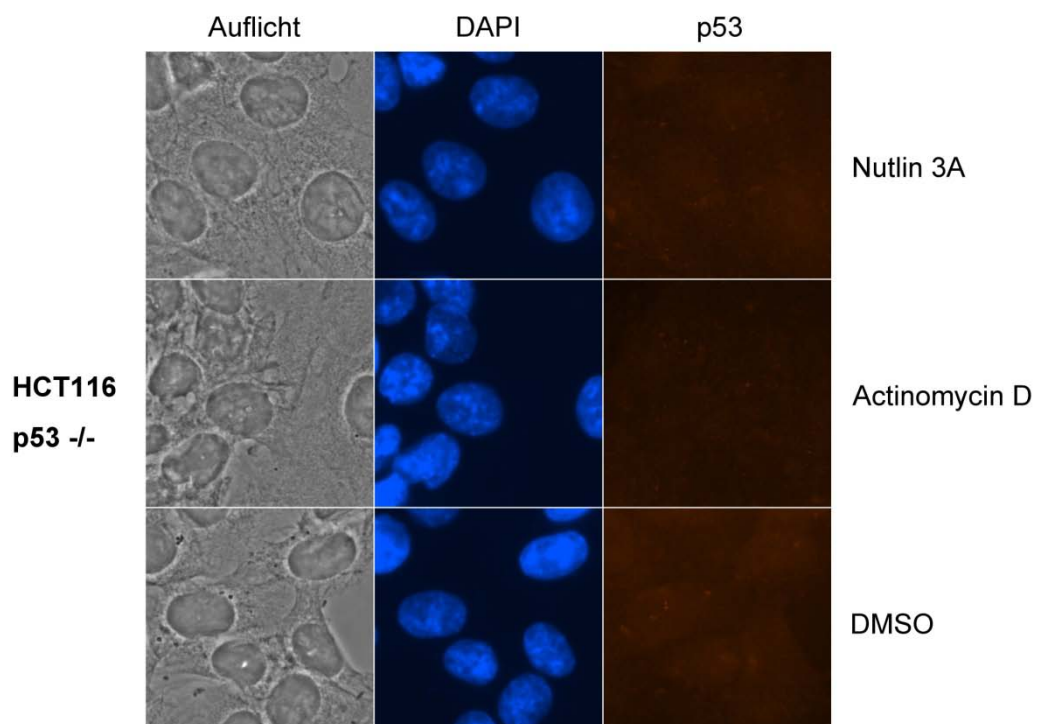
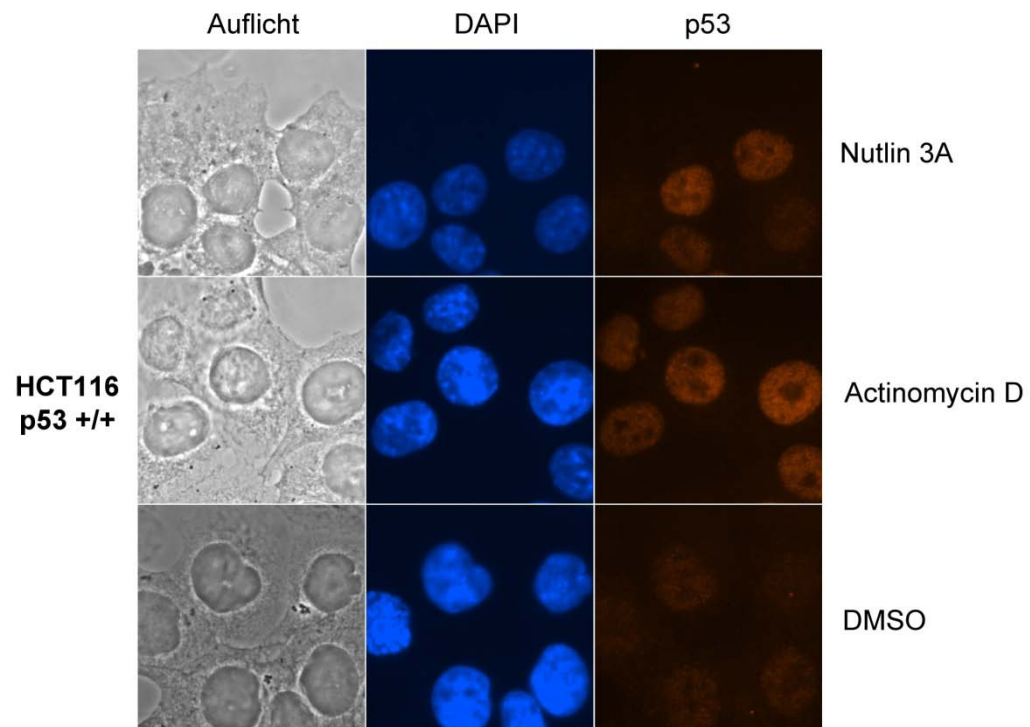
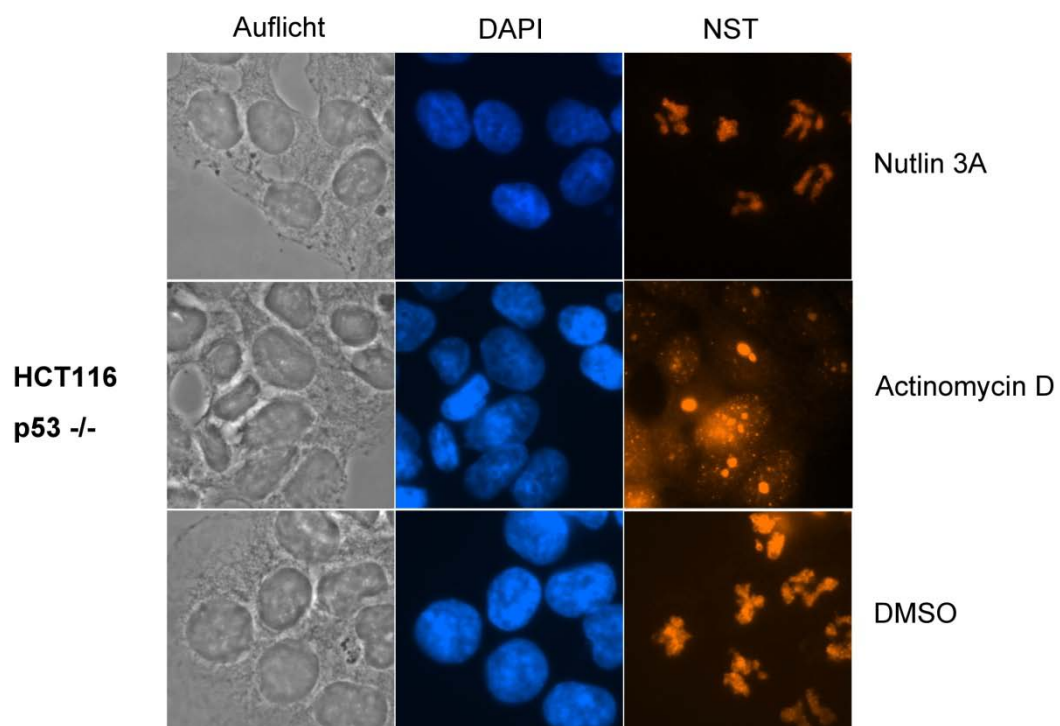
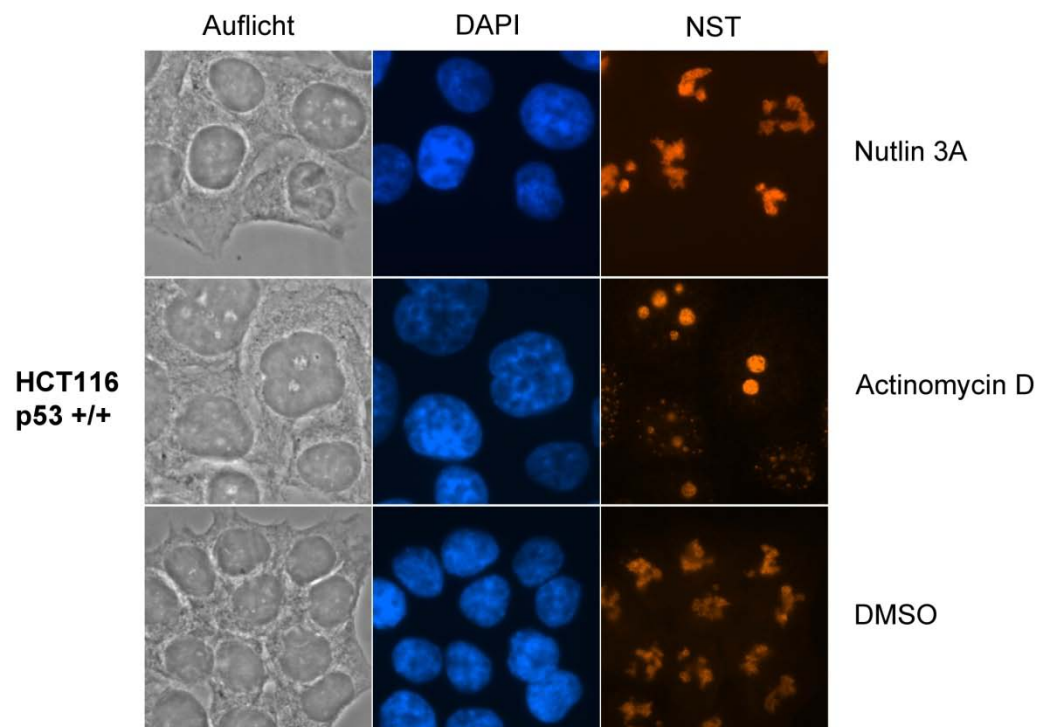


Abbildung 30 Eine Nutlin3A vermittelte p53 Stabilisierung induziert einen 32S rRNA Prozessierungsdefekt.

(A) In vivo radioaktiv markierte rRNA von HCT116- Zellen (p53 +/+ und p53 -/-), die mit den entsprechenden Substanzen behandelt worden sind (Nutlin3A, 6 μ M; Actinomycin D, 2,5 μ M, 14h Inkubationsdauer) DMSO ist das Lösungsmittel von Nutlin 3A und wurde im gleichen Volumen wie Nutlin3A dem Zellkulturmedium zugegeben. (B) Quantifizierung der radioaktiven Signale aus (A) mit Hilfe eines Phosphoimagers. Lokale Hintergrundintensitäten wurden von den erhaltenen Integralmesswerten subtrahiert. Um den Einfluss einer p53-Stabilisierung auf rDNA-Transkription und rRNA-Prozessierung besser beurteilen zu können, wurden die Signalintensitäten der 28S – und 47/45S rRNA separat dargestellt. (C) Die Stabilisierung des p53-Proteins nach Behandlung der beiden Zelllinien mit Nutlin3A und Actinomycin D. Es wurden gleiche Proteinmengen in jede Spur geladen (siehe Tubulin).(D) Quantifizierung der Proteinbanden-Signale nach chemilumineszenter Detektion mit Hilfe der Software ImageJ. Lokale Hintergrundintensitäten wurden von den erhaltenen Integralmesswerten subtrahiert.

7.3 Lokalisation der nukleolären Proteine p53, NST und UBF nach Nutlin3A-Behandlung von U2OS-Zellen





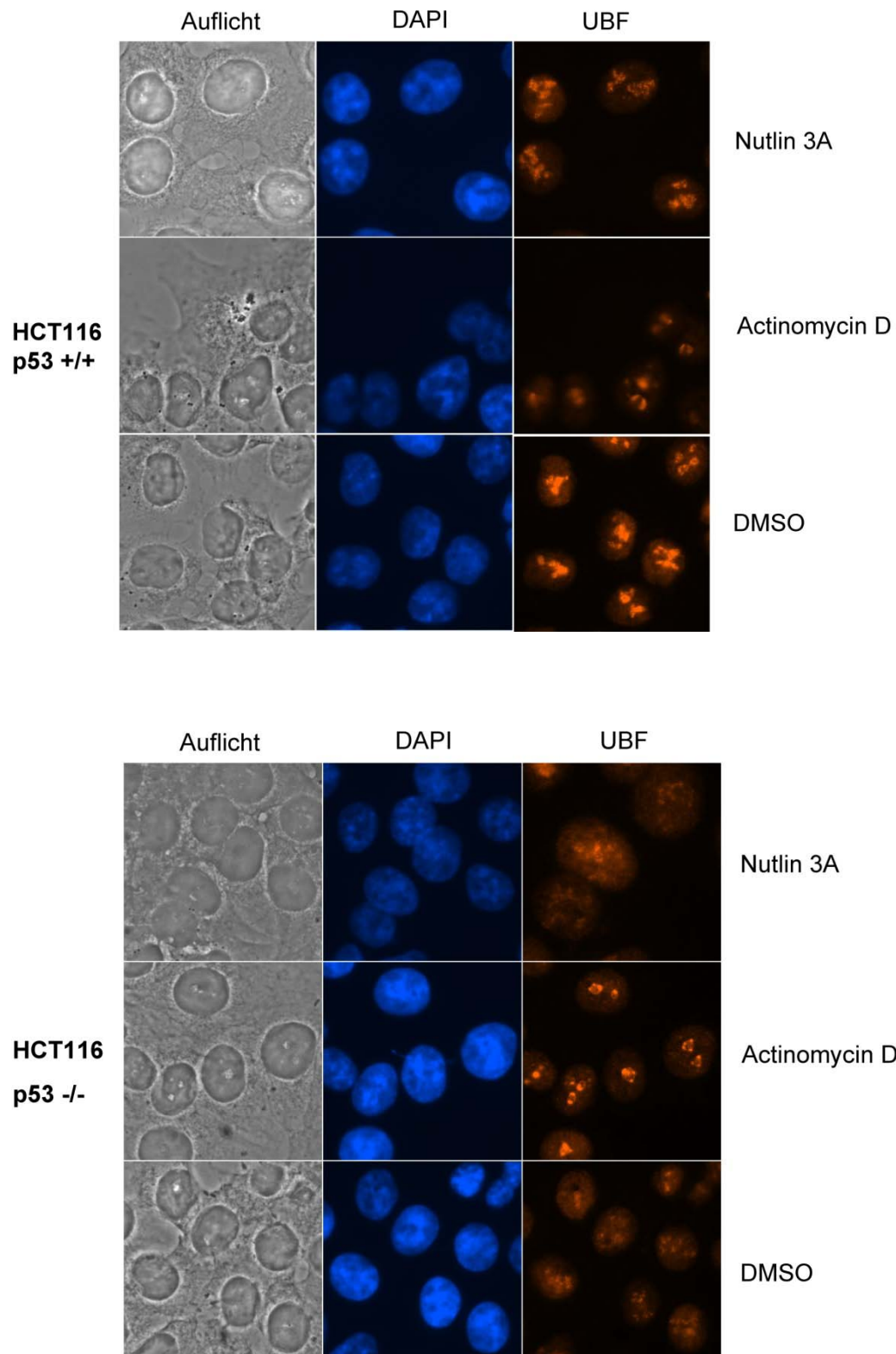


Abbildung 31 Lokalisation der Proteine p53, NST und UBF in HCT116-Zellen nach Nutlin 3A-, Actinomycin D- und DMSO-Behandlung.

Die Lokalisation der 3 endogenen Proteine wurde 14h nach Behandlung von HCT116 -Zellen mit den drei Substanzen überprüft.

7.4 Phylogenese des NST-Proteins

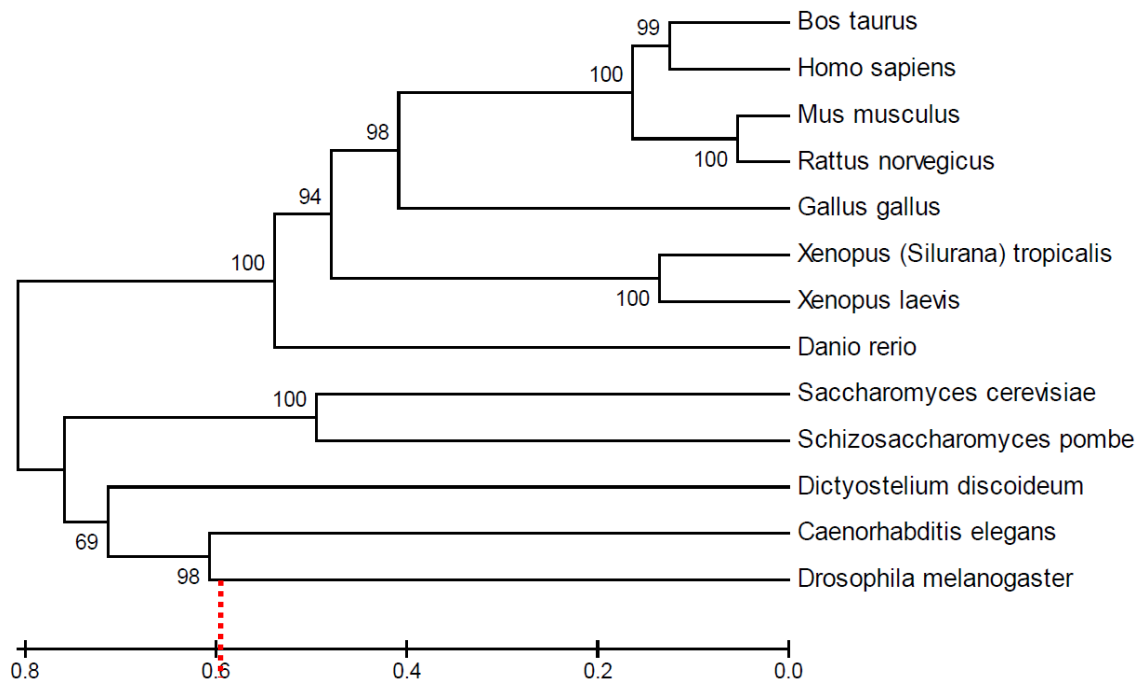


Abbildung 32 Phylogenetische Beziehungen von NST- Orthologen in 13 verschiedenen Spezies, basierend auf Poisson-korrigierter Distanz und der UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*)-Methode.

Die x-Achse zeigt die Poisson-korrigierte Distanz in Aminosäurenaustausche an jeder Position der NST-Konsensus-Proteinsequenz an. Die gestrichelte, rote Linie deutet somit an, dass sich die NST –Proteinsequenz von *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* um mehr als 60% unterscheidet. Die Zahlen an den Verzweigungspunkten geben die Detektionshäufigkeiten des entsprechenden Verzweigungspunktes unter den verwendeten Vorhersagebedingungen an. Der Verzweigungspunkt zwischen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* konnte somit in 98% aller Berechnungswiederholungen identifiziert werden.

Die Rekonstruktion des phylogenetischen Baumes erfolgte unter den folgenden Bedingungen: Methode : UPGMA (Unweighted Pair Group Methode mit arithmetischem Mittel); 500 Bootstrap-Wiederholungen; Fehlende Sequenzen wurden paarweise deletiert. Evolutionäre Rate an jeder Aminosäure-Position: dynamisch, nach Gamma 2.0 Verteilung; Modell: Poisson Korrektur Model.

7.5 Wahrscheinliche Proteinoberflächendomänen von NST

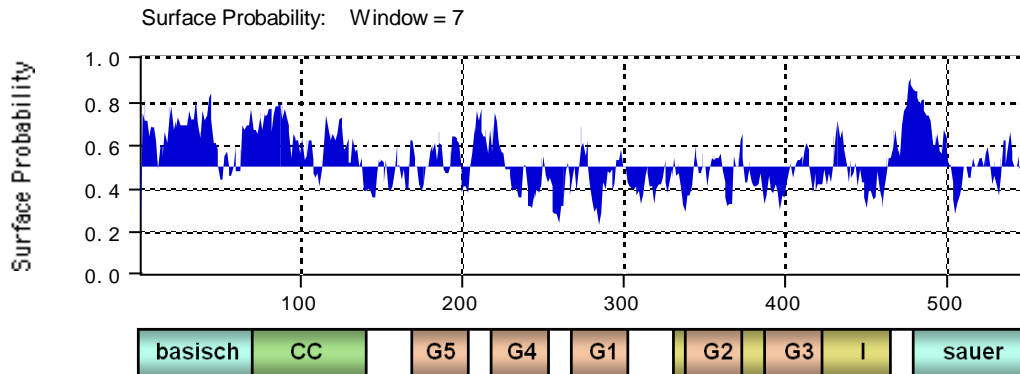


Abbildung 33 Algorithmus basierte Vorhersage der NST Proteinoberflächendomänen.

Dabei wurde für jede denkbare Heptanukleotidsequenz eine Oberflächenwahrscheinlichkeit berechnet (*window* = 7). Grundlage dieses vielfach angewendeten Algorithmus bilden empirische Daten aus bekannten 3D Strukturen von Proteinen. Der Algorithmus ist Bestandteil der *MacVector*® Software.

8 Curriculum vitae

Name/Anschrift:	Thomas Harasim Euckenstr.24 81369 Muenchen	Ausbildungsabschlüsse: Abitur (1998) Diplom-Biol. univ. (2005)
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Geburtstag	01.08.1978	

Ausbildungs- und Berufsentwicklung

<u>Monat/Jahr</u>	<u>Ausbildung/Abschluss</u>	<u>Firma/Institution</u>
07.2005-heute	Promotion Biologie	HelmholtzZentrum Mün.
10.99-05.05	Studium Biologie, Diplom	LMU, München
09.99-10.99	techn. Praktikum	Firma metabion
09.98-06.99	Wehrdienst	Bundeswehr der BRD
09.89-06.98	Abitur: Durchschnittsnote: 2,0	Gymnasium Unterhaching

*Studienfächer : Hauptfach Genetik, Biochemie, Immunologie, Anthropologie;
Diplomarbeit angefertigt im Institut für Klinische Molekularbiologie und
Tumorgenetik, Helmholtz-Zentrum Muenchen (Labor: Prof.Dr.Eick).*

9 Publikationen

Holzel, M., Orban, M., Hochstätter, J., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamousssi, A., Kremmer, E., Längst, G. und Eick, D., (2009) Defects in 18S or 28S rRNA-processing independently activate the p53 pathway. J. Biol. Chem., Manuskript versendet.

Burger, K., Mühl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamousssi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Holzel, M., and Eick, D., (2009) Ribosome biogenesis is a major target of chemotherapeutic drugs. Nucleic Acids Res, Manuskript versendet.

Harasim, T., Holzel, M., Orban, M., Rohrmoser, M., Malamousssi, A., Mühl, B., Burger, K., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Eick, D. (2009) The N-terminus of nucleostemin is a minimal functional unit in rRNA-processing. In Vorbereitung.

Archangelo, L.F., Greif, P.A., Holzel, M., Harasim, T., Kremmer, E., Przemeck, G.K., Eick, D., Deshpande, A.J., Buske, C., de Angelis, M.H., *et al.* (2008). The CALM and CALM/AF10 interactor CATS is a marker for proliferation. Mol Oncol 2, 356-367.

Grimm, T., Holzel, M., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamousssi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. Nucleic Acids Res 34, 3030-3043.

Haindl, M., Harasim, T., Eick, D., and Muller, S. (2008). The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. EMBO Rep 9, 273-279.

Holzel, M., Grimm, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Harasim, T., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 35, 789-800.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Orban, M., Homig, C., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Heissmeyer, V., Bornkamm, G., and Eick, D. (2007). Rapid conditional *knock-down-knock-in* system for mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35, e17.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., *et al.* (2005). Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol* 170, 367-378.

Rohrmoser, M., Holzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 27, 3682-3694.

10 Präsentationen

„Functional regulation of NPM/B23 in rRNA-processing via sumoylation“, „Harvard-munich“-Konferenz über molekulare Mechanismen von normaler und maligner Hämatopoese, Garmisch-Partenkirchen, 2008.

„Identifizierung von Domänen-abhängigen Funktionen eines Proteins mit Hilfe einer *knock-down knock-in* Strategie“, SFB684 Methodenseminar, Herrsching, 2008.

Posterpräsentationen:

„CRFG, a rRNA-processingfactor interacts with the PeBoW-complex“, Konferenz über „RNA Polymerase I transcription“, Regensburg, 2007 und „Molecular Mechanisms of Regeneration“, Spetses international summer school, . Spetses, Griechenland, 2007.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zur Anfertigung dieser Dissertation beigetragen haben. Dank an:

Herrn Prof. Dr. Eick, für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen und für Hilfestellungen, Verständnis und konstruktive Diskussionen während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Dr. Holzel, für die Planung des Forschungsprojektes, den zur Verfügung gestellten Materialien und der unbezahlbaren, technischen Hilfe bei der Etablierung einiger Methoden.

Frau Dr. Kremmer, für die Generierung des monoklonalen NST-Antikörpers.

Dr. Mulaw, für fruchtbare Diskussionen wissenschaftlicher, aber auch privater Natur. Dank auch für die konkrete Hilfe bei Fragen zur Statistik, Phylogenie und der Korrektur und Formatierung dieser Doktorarbeit !

Frau Pasquarella, für Verständnis und Motivation in einer schwierigen Zeit !

Meinen Kollegen, Frau Dr. Malamoussi, Frau Dr. Rohrmoser, Herr Heidemann, Herr Orban, Frau Hintermair, Herr Mühl, Herr Burger, Herr Kellner und Frau Gruber-Eber für Hilfe jeglicher Art und einem Laborumfeld, in dem es Spaß macht zu arbeiten.

Meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.